



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias**

Ensamblaje y maduración de la cápsida del virus de la bursitis infecciosa: Estructura y función de la proteasa viral VP4

- TESIS DOCTORAL -

Mariana Castrillo Briceño

Madrid, 2013



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA





Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
en Biología Molecular por

Mariana Castrillo Briceño

Universidad Autónoma de Madrid

Octubre de 2013

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Ruiz Castón
CNB-CSIC



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA



El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. José Ruiz Castón. Su financiación corrió a cargo de una beca del FONACIT del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela

AGRADECIMIENTOS

Los que me conocen saben que no me caracterizo precisamente por hablar poco, por lo que trataré de decir las cosas en modalidad “shortly speaking” y por tanto espero no estar olvidando a nadie.

Primero que nada quiero agradecer a mis padres porque gracias a ellos soy lo que soy hoy en día. Gracias por brindarme su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida Ma, Pa.. son los mejores! Sin ustedes nada de estos 80 años estudiando hubiesen sido posibles. Gracias por siempre apoyarme en todo lo que he emprendido, creer en mí y siempre escucharme cuando me quejo, rio, lloro o sencillamente hablo por hablar. Los quiero muchísimo y les prometo que no estudio más!!.... creo.

Quiero agradecer a mi director de tesis Pepe Castón por haberme recibido en su equipo y haberme brindado la oportunidad de trabajar junto a él, aprendiendo constantemente sobre el mundo de la ciencia, guiándome y apoyándome durante estos cuatro años, estando siempre disponible para cualquier consulta o discusión. Quiero agradecer a nuestros colaboradores y a todas las personas que, de una manera u otra, han ayudado a la culminación de este proyecto. A Paloma Rueda por permitirnos trabajar con su sistema de baculovirus recombinante, mostrándose siempre dispuesta a ayudarnos y a Mercedes Montón por su ayuda con toda la parte técnica. A Javier Rodríguez por su ayuda en los ensayos de actividad y por estar siempre disponible para cualquier consulta. Al servicio de microscopía electrónica del CBMSO, especialmente a Maite Rejas por su ayuda con el sombreado metálico. Al servicio de Proteómica del CNB, especialmente a Alberto Paradela por su disponibilidad, paciencia y ayuda con los análisis de masas más allá de lo requerido por su servicio. A Fernando González por su ayuda y siempre buen ánimo con los ensayos de inmunofluorescencia y a Carmen Terrón por su colaboración con los análisis ultraestructurales.

A mis compañeros de laboratorio: Ana, Carlos, Dani, Elena y Josué, que han hecho de estos cuatro años una experiencia muy divertida y enriquecedora, siempre he podido contar con ustedes cuando lo necesitaba.. han sido los mejores! A Elena por entenderme perfectamente con los colorinches, las notitas de amor en 4D, las fiestas de los 10mil pipetazos y tantas cosas que gastaría todas las páginas destinadas a la tesis para decirlo.. simplemente gracias por toda tu ayuda y apoyo durante este tiempo. A Carlos por siempre estar dispuesto a echar una mano en todo y lo mejor.. no haberme matado con tu super fuerza por meterme tanto contigo, sabes que lo hago desde el cariño. A Josué por tenerme paciencia con cada pregunta idiota sobre computación (sí, computación

porque somos del otro lado del charco y así se dice) y obviamente por ayudarme con todo el procesamiento. A Ana por nuestros bailes de la victoria (aunque no han sido tantos como deseaba) y por no odiarme por “echar a perder tu castellano”. A Dani por siempre estar disponible y dispuesto a ayudarme con cualquier duda aportando ideas y sugerencias útiles, gracias por todo el análisis y procesamiento de estructuras y por la paciencia que me has tenido... en fin gracias totales a todos!!

A los integrantes del S0, S1, 117 y el resto del S5 que nos abandonaron por un instituto “solo para ellos”, muchas gracias por dejarme siempre “robar” y estar ahí para cualquier duda o problema, con la mejor de las disposiciones y ánimos. Muchas gracias Sara, Jorge, Srdja, Bego, Ana C, Ana B, Rebeca, JoseMari, Pepe, Charo, José Jesús, Mariángeles, Marina, Marta, Vero, Mar, Javi Conesa, Javi Chichón, Elías, Michele, Alina, María, Encarna, Rocío, Borja, Jose (sabes que me extrañas), Ricardo, MariJose, Paco, Diego, Romy, Ana O, Fer, Antonio, Gema, Tomás.

A mis compañer@s de comida y cafés MUCHAS GRACIAS porque sin ustedes no habría sido lo mismo, por siempre estar ahí cuando l@s he necesitado, por aceptarme tal cual soy y permitirme enseñarles un poco de Venezuela, se han convertido en una parte de mi familia que cada vez se encuentra más regada por el mundo. Nere, a pesar de haber sido la primera en abandonar el nido siempre has estado presente, gracias por tu ayuda al principio, mitad y final de todo! Espero seguir contando contigo de una manera menos “complicada”. Ido, muchas gracias por tus momentos en idoialandia, son únicos! y por siempre darme ánimos. Susana de Lucas, gracias por ser la voz de la conciencia en nuestro grupo, por poner un poco de orden y siempre estar ahí para cuando se te necesita. Susana Guerra, gracias por tu risa y buen humor constante aún si el mundo se cae a pedazos. Sonia, gracias por la paz, tranquilidad y felicidad que siempre transmites. Laura, gracias por las “amenas” conversaciones a la hora de la comida, no serian lo mismo sin ti!. Carlos, gracias por aguantarnos y esos comentarios oportunos y acertados cuando nadie sabe que a pesar de todo nos estas escuchando. Marta, gracias por siempre encontrarle el lado bueno a todo y todos, por enseñarme polaco y decir que lo hago bien! Ana, gracias por tu genialidad y comentarios acertados, y porque a pesar que no te guste el chocolate te queremos! Diego, gracias por todos esos “cafés” e indicaciones a la M-30, por siempre escucharme, apoyarme, aconsejarme y ayudarme sin importar hora ni día.

A toda mi familia y amigos del otro lado del charco (o de este), por siempre siempre estar ahí a pesar de la distancia y diferencia de hora, por escucharme, aconsejarme y

estar pendientes de mi a pesar que últimamente he estado más perdida que el hijo de Lindbergh. Gracias a mis hermanos Andrés y Ale, por ser como son, los quiero mucho y no los cambio por nada! A Adriana por ser mi hermana y estar siempre al pie del cañón para lo que sea, porque hemos estado siempre juntas (mas no revueltas) y espero seguir así muchos años mas sea donde sea!

Y puedo seguir así, nombrando a toda la gente con la que hablo todos los días o cada mil años y que siempre me han ayudado y dado ánimos para continuar día a día, y que gracias al Sr, FB esa distancia se ha hecho mucho más corta y divertida!

Finalmente quiero agradecer a mi abuela, eres la mejor del mundo y sé que desde donde estés nos estas cuidando a todos y sintiéndote orgullosa de la familia que tenemos. Te extraño muchísimo pero te quiero más, y cada día que pasa agradezco todo lo que me has enseñado, esta tesis va por las dos!

ABREVIATURAS

3D:	Tridimensional	MW:	peso molecular
3DR:	reconstrucción	ORF:	fase abierta de lectura
	Tridimensional	pb:	par de bases
aa:	Aminoácido	PBS:	tampón fosfato salino
BSA:	seroalbúmina bovina	PCR:	reacción en cadena de
BSNV:	virus de la cabeza de		la polimerasa
	serpiente manchada	PDB:	base de datos de proteínas
crioME:	criomicroscopía electrónica		(Protein Data Bank)
CTF:	función de transferencia	PEG:	polietilenglicol
	de contraste	pfu:	unidad formadora de placa
DNA:	ácido desoxiribonucleico	PIPES:	piperazina-N,N-bis
DNasa:	desoxiribonucleasa		(ácido 2-etanosulfónico)
dsDNA:	ácido desoxiribonucleico	PurSA:	aminopeptidasa sensible
	de cadena doble		a puromicina
dsRNA:	ácido ribonucleico	RdRp:	RNA polimerasa RNA
	de cadena doble		dependiente
DMEM:	medio de Eagle modificado	RNA:	ácido ribonucleico
	por Dulbecco	RNasa:	ribonucleasa
dNTP:	desoxinucleótido trifosfato	RNP:	ribonucleoproteína
DTT :	ditiotreitól	rBV:	baculovirus recombinante
DXV:	virus X de Drosophila	T:	número de triangulación
EDTA:	ácido	Tris:	tri-(hidroximetil)-
	etilendiaminotetraacético		aminometano
FCS:	suero fetal de ternero	TV-1	Tellina virus tipo I
FSC:	Fourier Shell Correlation	SSE:	elementos de estructura
hpi.:	horas postinfección		secundaria
HT:	cola de histidinas	SDS:	dodecil sulfato sódico
	(Histidine Tag)	SDS-PAGE:	electroforesis en geles
IBDV:	virus de la bursitis		desnaturalizantes de
	infecciosa		poliacrilamida
IPNV:	virus de la necrosis	VLP:	pseudopartícula viral
	pancreática infecciosa	WB:	inmunodetección de
			proteínas en membrana
kb:	Kilobase		(Western blot)
ME:	microscopía electrónica	YAV:	virus de la ascitis de la
MOI:	multiplicidad de infección		cola amarilla
mRNA:	ácido ribonucleico		
	mensajero		

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala, A	Lisina	Lys, K
Arginina	Arg, R	Metionina	Met, M
Ácido aspártico	Asp, D	Fenilalanina	Phe, F
Asparagina	Asn, N	Prolina	Pro, P
Cisteína	Cys, C	Serina	Ser, S
Ácido Glutámico	Glu, E	Tirosina	Tyr, Y
Glicina	Gly, G	Treonina	Thr, T
Glutamina	Gln, Q	Triptófano	Trp, W
Histidina	His, H	Valina	Val, V
Isoleucina	Ile, I		
Leucina	Leu, L		

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. Introducción	3
1.1 Estructura y función de la cápsida viral	5
1.2 Ensamblaje de la cápsida viral	7
1.2.1 Proteínas de andamiaje en el ensamblaje viral	8
1.2.2 Factores del huésped implicados en el ensamblaje de la cápsida: chaperonas	9
1.3 Maduración de la cápsida	9
1.3.1 Proteasas	9
1.4 El virus de la bursitis infecciosa	10
1.4.1 La bursitis infecciosa	11
1.4.2 Organización genómica de IBDV	12
1.4.3 Componentes estructurales de IBDV	13
1.4.4 La proteasa viral VP4	16
1.4.5 Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV	18
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	27
3.1 Material biológico	29
3.1.1 Células procariotas	29
3.1.2 Células eucariotas	29
3.1.3 Plásmidos	29
3.1.4 Virus	30
3.1.5 Anticuerpos	30
3.2 Manipulación y obtención de vectores recombinantes	30
3.2.1 Amplificación de fragmentos por PCR	30
3.2.2 Reacciones de restricción enzimática	31
3.2.3 Reacciones de ligación de fragmentos de DNA	31
3.2.4 Generación de plásmidos recombinantes	31
3.2.5 Generación de baculovirus recombinantes	32
3.3 Infecciones y expresión de proteínas	32
3.3.1 Infección con rBVs	32
3.3.2 Infección con rVV vT7/LacOI/Poly	33

3.3.3 Infección con IBDV	33
3.3.4 Titulación de stocks de rVV e IBDV	33
3.3.5 Transformación bacteriana y expresión de VP4	33
3.3.6 Secuenciación de baculovirus recombinantes	34
3.4 Purificación de proteínas y ensamblados virales	34
3.4.1 Purificación de proteínas y ensamblados derivados de la expresión con rVVs	34
3.4.2 Purificación de viriones de IBDV	34
3.4.3 Purificación de VLPs derivadas de la expresión de rVV vT7/LacOI/Poly	35
3.4.4 Purificación de VP4	35
3.4.5 Purificación del bacteriófago T4	36
3.5 Análisis bioquímico	36
3.5.1 Análisis electroforético en geles desnaturizantes de poliacrilamida	36
3.5.2 Electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	36
3.5.3 Determinación de la concentración de proteína	37
3.5.4 Identificación de proteínas por espectrometría MALDI-TOF/TOF	37
3.6 Inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal	38
3.7 Microscopía electrónica	38
3.7.1 Contraste de las muestras	38
3.7.2 Análisis ultraestructural de la infección con IBDV	39
3.7.3 Criomicroscopía electrónica	39
3.7.4 Procesamiento digital de especímenes con simetría icosaédrica	40
3.7.5 Procesamiento digital de especímenes con simetría helicoidal	41
3.7.6 Alineamiento múltiple de secuencias de VP4 y predicción de SSE	42
3.7.7 Modelado por homología y ajuste flexible	43
4. Resultados	45
4.1 Ensamblados macromoleculares de IBDV a partir de distintos sistemas de baculovirus	47
4.1.1 Análisis de estructuras virales en células infectadas con IBDV	47
4.1.2 Análisis por IF de células infectadas por rBV FB-Poly y AcYM1-Poly	49
4.1.3 Análisis bioquímico y por microscopía electrónica de las estructuras derivadas de la expresión de FB-Poly	50
4.1.4 Análisis bioquímico y por microscopía electrónica de las estructuras derivadas de la expresión de AcYM1-Poly	52
4.1.5 Identificación de las proteínas estructurales derivadas de AcYM1-Poly	53
4.1.6 Criomicroscopía electrónica tridimensional de las procápsidas AcYM1-Poly de IBDV	56
4.1.7 Análisis de las estructuras generadas en co-infecciones de AcYM1-Poly y FB-HTVP4	57

4.1.8 Análisis de la secuencias peptídicas de FB-Poly y AcYM1-Poly	60
4.1.9 Efecto de la sustitución R505H en el ensamblaje de la cápsida de IBDV	61
4.2 Caracterización estructural y funcional de la proteasa viral VP4	63
4.2.1 Expresión y purificación de VP4 en <i>E. coli</i> y células de insecto	63
4.2.2 Optimización de las preparaciones de VP4 para crio-ME	64
4.2.3 Crio-ME y análisis por sombreado metálico de la estructura helicoidal de VP4	65
4.2.4 Reconstrucción tridimensional de la estructura helicoidal de VP4	66
4.2.5 Modelo pseudo-atómico de la estructura helicoidal de VP4	69
4.2.6 Interacciones proteicas que estabilizan los tubos de VP4	71
4.2.7 Cambios conformacionales que bloquean el sitio activo de VP4	73
5. Discusión	75
5.1 Ensamblaje de la procápsida de IBDV	77
5.2 Estructura de la proteasa viral de IBDV	81
6. Conclusiones	85
7. Bibliografía	89

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

<i>Figura 1. Estrategias para el ensamblaje de cápsidas virales</i>	8
<i>Figura 2. Organización genómica de IBDV</i>	12
<i>Figura 3. Estructura de la cápsida de IBDV</i>	14
<i>Figura 4. Estructura de VP2</i>	15
<i>Figura 5. Estructura de VP3</i>	16
<i>Figura 6. Estructura de las proteasas de birnavirus</i>	17
<i>Figura 7. Sitio activo de la proteasa de birnavirus</i>	18
<i>Figura 9. Modelo propuesto para el ensamblaje de IBDV</i>	21
<i>Figura 10. El algoritmo IHRSR</i>	43
<i>Figura 11. Secciones ultrafinas de células QM7 infectadas con IBDV</i>	48
<i>Figura 12. Análisis de la distribución subcelular de proteínas virales por IF en células QM7 infectadas con IBDV</i>	49
<i>Figura 13. Análisis por IF de la expresión de la poliproteína de IBDV mediante los rBV</i>	51
<i>Figura 14. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la expresión de FB-Poly</i>	52
<i>Figura 15. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la expresión de AcYM1-Poly</i>	53
<i>Figura 16. Análisis de las proteínas estructurales derivadas de AcYM1-Poly</i>	54
<i>Figura 17. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de las proteínas derivadas de AcYM1-Poly</i>	55
<i>Figura 18. Relación entre las proteínas precursoras derivadas AcYM1-Poly en los ensamblados purificados en gradientes de sacarosa</i>	56
<i>Figura 19. Criomicroscopía electrónica y reconstrucción 3D de VLPs de AcYM1-Poly y vT7/LacOI/Poly</i>	58
<i>Figura 20. Efecto de la co-infección de AcYM1-Poly con FB-HTVP4</i>	59
<i>Figura 21. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la co-expresión de AcYM1-Poly y FB-HTVP4</i>	60

<i>Figura 22. Alineamiento de las secuencias de la poliproteína de IBDV (cepa Soroa), FB-Poly y AcYM1-Poly</i>	61
<i>Figura 23. Análisis por IF de la expresión de la poliproteína de IBDV con FB-Poly-R505H</i>	62
<i>Figura 24. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la expresión de FB-PolyR505H</i>	63
<i>Figura 25. Expresión y purificación de HT-VP4 en E. coli</i>	64
<i>Figura 26. Optimización de las fracciones de VP4 para su análisis por crio-ME</i>	65
<i>Figura 27. Anotación de la red helicoidal del tubo de VP4</i>	66
<i>Figura 28. Análisis de convergencia de los parámetros de simetría helicoidal del tubo de VP4</i>	67
<i>Figura 29. Estructura tridimensional del tubo de VP4</i>	68
<i>Figura 30. Estructura tridimensional de los tubos de VP4 y predicción de estructuras secundarias</i>	69
<i>Figura 31. Alineamiento de secuencia y SSE de las VP4 de birnavirus</i>	70
<i>Figura 32. Ajuste flexible del modelo pseudo-atómico de la VP4 de IBDV</i>	71
<i>Figura 33. Acoplamiento de la estructura de VP4 de IBDV en la reconstrucción helicoidal</i>	72
<i>Figura 34. Interacciones del amino terminal de VP4</i>	72
<i>Figura 35. Interacciones interdiméricas</i>	73
<i>Figura 36. Mapas de superficie de los monómeros de VP4</i>	74
<i>Figura 37. Interacciones del carboxilo terminal de VP4 que conforman el dímero e inactivan a la proteasa</i>	74
<i>Figura 38. Curvatura de los pentámeros y hexámeros en la cápsida viral</i>	79

TABLAS

<i>Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la generación de construcciones de VP4</i>	31
<i>Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la generación de los mutantes puntuales de pFastBac-HTVP4-K180A y pFastBac-Poly-R505H</i>	32

ABSTRACT

Infectious bursal disease virus (IBDV) is a polyploid, bisegmented dsRNA virus with a single, non-enveloped ~70-nm-diameter capsid with a T=13I lattice. The capsid structural units are trimers of a single protein, VP2. The VP2 precursor form is encoded as part of the polyprotein NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH; VP4 is the viral protease, able to cleave its own N and C termini, and VP3 is a multifunctional protein with scaffolding and dsRNA-binding activities.

Expression of the IBDV viral polyprotein leads to formation of different macromolecular assemblies, depending on the heterologous expression system used. We analyzed IBDV assembly using various baculovirus systems. Whereas expression with the pFastBac vector led to production of rigid pVP2 helical assemblies, expression with the pAcYM1 vector led to assembly of spherical virus-like particles (VLP) and flexible tubes. Western blot and mass spectrometry analyses showed that spherical VLP were formed by the entire polyprotein, the pVP2, and the intermediate precursor VP4-VP3, suggesting that VP4 activity is partially inhibited. Three-dimensional cryo-electron microscopy (3D cryo-EM) of these assemblies showed that, compared to the VLP with a marked polyhedral contour or the virion capsid, the VLP internal surface has extra densities, which would correspond to the protein portions of precursors not removed proteolytically. These results indicate that IBDV capsid assembly proceeds through a procapsid intermediate that requires further proteolytic maturation. Sequence analysis of the polyprotein in the context of the pAcYM1 system detected only the R505H substitution, suggesting that, after excluding any mutations in the VP4 sequence, the context of the processing sites determines VP4 activity. Assembly of IBDV immature capsids from polyprotein precursors in conditions that compromise pVP2/VP4 and VP4/VP3 cleavage resembles the assembly of the Gag precursor in immature HIV virions.

Finally, we analyzed VP4 helical structures, which are assembled naturally in IBDV-infected cells, by 3D cryo-EM at subnanometer resolution. VP4 tube is a right-handed three start helix, made of VP4 dimers, with an axial rise of 18.4 Å and an azimuthal angle of 40.6°. To better understand the architecture and role of VP4 helical structure, we built a pseudo-atomic structure of VP4 by homology modeling, as the birnavirus VP4 showed a conserved overall structure despite a low level of sequence identity. Analysis of the resulting hybrid structure after flexible docking of the VP4 comparative model showed the intra- and interdimeric interactions that stabilize the VP4 holocomplex. Potential conformational differences provided new information on the mechanism of inactivation, as they showed that the catalytic serine/lysine dyad, located on a surface crevice, is blocked in the assembled VP4. This conformational change is induced by the VP4 C terminus-mediated interdimeric contacts, and suggest that once that has achieved its proteolytic function, VP4 is inactivated by assembly into helical structures to prevent lethal damage to the virus or the host components needed for virus multiplication.

1. Introducción

Los virus representan un paradigma en economía de la información tanto en su estrategia de reproducción y diseminación, como en su propia construcción. Resulta realmente sorprendente cómo los virus llevan a cabo las complejas funciones de su ciclo vital teniendo en cuenta su limitado contenido en información genética. En su forma más simple, un virus está formado por el ácido nucleico y un contenedor proteico, la cápsida, que lo protege del ambiente exterior durante su fase extracelular. Las partículas virales varían enormemente en tamaño y forma, así como también en el número y naturaleza de las macromoléculas de las que se componen. Sin embargo, desempeñan funciones similares y se rigen por los mismos principios generales (Castón y Carrascosa, 2013; Harrison, 2007)

1.1 Estructura y función de la cápsida viral

La función primaria de la cápsida viral es la de proteger el genoma frente a agentes físicos y químicos del entorno. Además, la cápsida participa activamente en numerosos procesos a lo largo del ciclo viral: selecciona el ácido nucleico viral en el entorno celular, busca su salida, protege el genoma viral durante su transporte de un hospedador a otro, reconoce la siguiente célula huésped, se internaliza en ella y, finalmente, libera el ácido nucleico para su replicación (Flint *et al.*, 2009; Mateo, 2004). Algunas cápsidas también participan activamente en la replicación del genoma viral. Además, todas estas funciones son compaginadas con elevadas tasas de mutación para evitar el sistema inmune en vertebrados. Por tanto, la visión de las cápsidas como estructuras cerradas inertes, meros contenedores del material genético, es poco adecuada ya que experimentan profundas modificaciones estrechamente relacionadas con el momento del ciclo vital del virus (Baker *et al.*, 1999; Prasad y Schmid, 2012). La cápsida puede ser considerada como una estructura metaestable: un compromiso entre la estabilidad, necesaria para que los virus sobrevivan en el medio extracelular, y la inestabilidad, ya que debe ser capaz de convertirse en estructuras lábiles para permitir la liberación del genoma en el interior de la célula huésped tras la interacción con los receptores celulares (Chow *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Rossmann *et al.*, 1997). En general, los virus han desarrollado soluciones estructurales únicas frente a las numerosas presiones selectivas impuestas por las diversas funciones que sus cápsidas deben desarrollar a lo largo del ciclo viral (Chow *et al.*, 1997; Johnson, 1996; Rossmann *et al.*, 1997).

Dada la limitada capacidad codificante impuesta por el tamaño de su genoma, el ensamblaje eficiente de una partícula viral radica en dos aspectos, la aplicación de elementos de simetría y el polimorfismo natural de las proteínas estructurales (Cardone *et al.*, 2009; Dokland, 2000; Gertsman *et al.*, 2009; Steven *et al.*, 2005). El uso de relaciones de simetría permite generar

estructuras tridimensionales de forma y tamaños definidos a partir de una serie de copias de una o unos pocos componentes proteicos. Las subunidades proteicas que forman las cápsidas interaccionan entre sí mediante enlaces no covalentes y en general débiles, con la excepción del bacteriófago HK97 donde las subunidades estructurales forman enlaces covalentes (Hendrix y Johnson, 2012; Popa *et al.*, 1991). La estabilidad de la partícula viral se consigue por la cooperación de múltiples interacciones de tipo iónico, hidrofóbico, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals, que se establecen al adoptar las subunidades proteicas posiciones determinadas por relaciones de simetría. Estas interacciones débiles son de enorme trascendencia ya que permiten una cierta flexibilidad en los contactos intersubunidades (contactos equivalentes pero no idénticos), lo que implica ligeras variaciones en la estructura tridimensional (3D) de las subunidades proteicas.

Excepto en los virus complejos, de las numerosas formas y tamaños entre las diferentes familias virales, las dos clases principales de simetrías observadas en las cápsidas son la simetría icosaédrica y helicoidal (Cann, 2012; Flint *et al.*, 2009). La simetría helicoidal simplifica el ensamblaje de la cápsida y es flexible en cuanto al empaquetamiento del genoma. Las subunidades que conforman la cápsida helicoidal se disponen en hexámeros planos, que proporcionan entornos idénticos, con un determinado ángulo de curvatura impuesto por las interacciones entre las subunidades que determina el diámetro del tubo. Sin embargo es relativamente ineficiente ya que menos del 10% de las familias virales tienen simetría helicoidal, siendo la mayoría virus de plantas y bacteriófagos (Abrescia *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 1999; Bamford *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2003).

El icosaedro es una partícula cerrada con simetría cúbica que permite posicionar el mayor número de subunidades asimétricas en su superficie manteniendo interacciones idénticas y, por tanto, es la estructura regular más económica en términos genéticos. Además, esta estructura presenta la relación superficie/volumen más baja, siendo por tanto el poliedro con la mayor capacidad de almacenamiento por unidad de información genética. Los virus icosaédricos pueden ser descritos mediante la teoría de la cuasiequivalencia y el concepto del número de triangulación T (Caspar y Klug, 1962). Los virus icosaédricos más simples están formados por 60 subunidades idénticas formando exclusivamente pentámeros (cápsidas T=1). Las cápsidas con más de 60 subunidades se ensamblan en pentámeros y hexámeros por lo que no pueden tener interacciones (o conformaciones) idénticas sino cuasiequivalentes (cápsidas con T>1).

En teoría la cuasiequivalencia implica pequeñas diferencias en las interacciones o conformaciones de las subunidades. En la práctica, los virus muestran un amplio rango de

adhesión a este principio y se han descrito cápsidas equivalentes, cuasiequivalentes y no equivalentes. El control de los diferentes estados conformacionales está modulado por diferentes factores denominados interruptores moleculares (del inglés “*molecular switches*”) que pueden ser segmentos peptídicos intrínsecos, regiones de RNA, iones metálicos, variaciones de pH, o distintas combinaciones de éstos (Johnson, 1996; Johnson, 2008). Estos interruptores moleculares suelen ser insuficientes en la formación de cápsidas complejas (o con elevados T), y se requiere la participación de una o varias proteínas auxiliares, como proteínas de andamiaje, o el propio ácido nucleico, que van a actuar como factores morfogénéticos (Dokland, 2000; Irigoyen *et al.*, 2012; Mateu, 2013; Morais *et al.*, 2004). A pesar de la gran flexibilidad y posibilidades que ofrecen las cápsidas icosaédricas cuasiequivalentes, en numerosas ocasiones se requiere de más de una proteína estructural. En estos virus no se puede hablar de cuasiequivalencia en sentido estricto, ya que las posiciones cuasiequivalentes están ocupadas por distintas proteínas, y se refieren como pseudo-números de triangulación (P) (por ejemplo P=3 en los picornavirus)

1.2 Ensamblaje de la cápsida viral

La cápsida de virus sencillos (por ejemplo, con simetría helicoidal o icosaédrica T=1) puede ensamblarse espontáneamente bajo condiciones adecuadas a partir de numerosas copias de la proteína estructural. Es decir, las “instrucciones” para el ensamblaje están contenidas en la estructura terciaria de la subunidad. Sin embargo, la formación de una partícula viral compleja suele implicar en numerosas ocasiones ensamblados intermediarios transitorios en los que las proteínas de andamiaje y/o el ácido nucleico interaccionan con las subunidades de la cápsida para promover y dirigir eficientemente el proceso de oligomerización (Figura 1). Además, muchas cápsidas experimentan un proceso de maduración que implica modificaciones covalentes y/o cambios conformacionales que incrementan la estabilidad de la partícula (Mateu, 2013).

Las unidades de ensamblaje de las cápsidas (o CBB, *capsid building blocks*) varían desde los monómeros de las proteínas de la cápsida a oligómeros como dímeros, trímeros, pentámeros o hexámeros. La estrategia más simple implica el autoensamblaje de las CBB, pero en algunos casos se requiere un proceso de activación para ser competentes para el ensamblaje. Existen dos estrategias de empaquetamiento de los genomas virales, o bien a partir de una procápsida ensamblada en un proceso realizado por un motor molecular con gasto de ATP (Johnson y Chiu, 2007; Speir y Johnson, 2012; Sun *et al.*, 2010), o en un proceso que ocurre al mismo tiempo que el ensamblaje de la cápsida (Johnson y Rueckert, 1997).

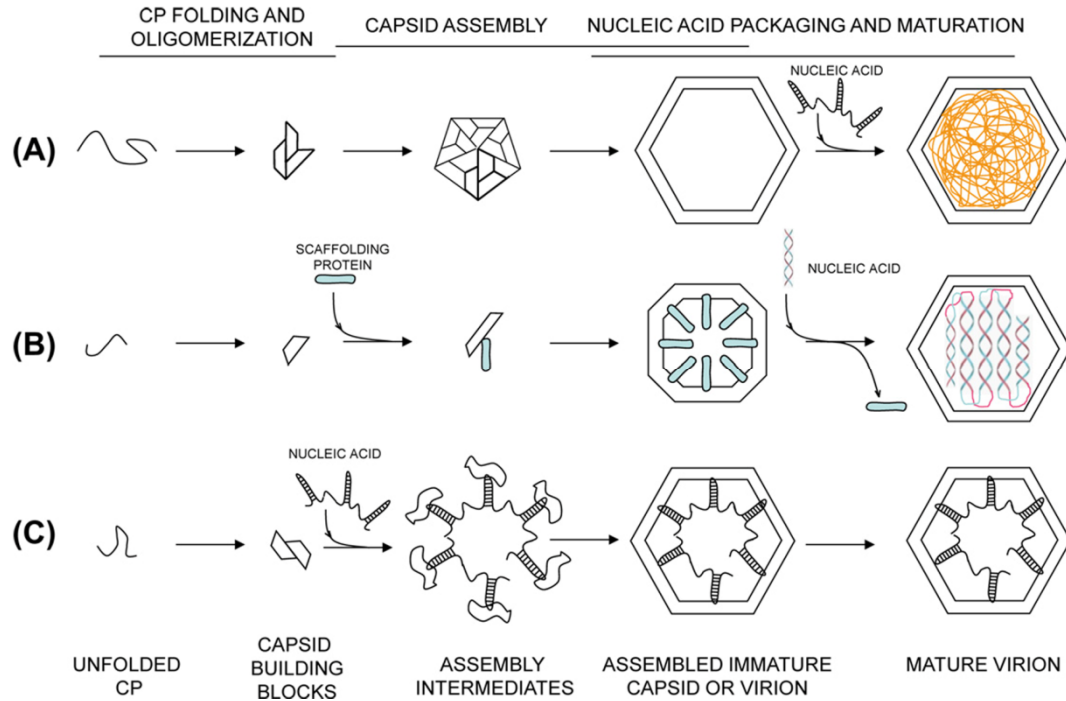


Figura 1. Estrategias para el ensamblaje de cápsidas virales. (A) Autoensamblaje de las subunidades estructurales de la cápsida (B) Ensamblaje mediado por proteínas de andamiaje (C) Ensamblaje mediado por unión al ácido nucleico (Mateu, 2013).

1.2.1 Proteínas de andamiaje en el ensamblaje viral

Muchos bacteriófagos DNA de cadena doble (dsDNA) y herpesvirus forman una procápsida y posteriormente es empaquetado en DNA. La procápsida se ensambla por la interacción específica (pero transitoria) entre la proteína estructural de la cápsida y la proteína de andamiaje (Black y Rao, 2012; Cardone *et al.*, 2012). Una vez que la procápsida se forma, las copias internas de la proteína de andamiaje son eliminadas antes o durante el empaquetamiento del DNA (mediante proteólisis como en T4 y λ , o liberadas y recicladas como en P22, T7 y ϕ 29). También se han descrito proteínas de andamiaje que se ensamblan sobre el exterior de la cápsida, como en los fagos ϕ X174 y P4 (Chang *et al.*, 2008; Uchiyama *et al.*, 2009). En el fago HK97, un dominio de la propia proteína de la cápsida (dominio Δ) actúa como proteína de andamiaje interna y, una vez que la procápsida se ha formado, este dominio es eliminado proteolíticamente (Duda *et al.*, 2013).

Las proteínas de andamiaje tienen un alto contenido en hélices α (Steven *et al.*, 2005) y están implicadas en múltiples funciones además de actuar como iniciador del ensamblaje de la cápsida por nucleación, ya que también promueven el ensamblaje mediante el aumento de la concentración efectiva de protómeros, y/o disminuyendo la barrera energética de la transición

conformacional de la proteína de la cápsida de un estado de ensamblaje incompetente a competente, dirigen el ensamblaje a una estructura cuaternaria correcta y median la incorporación de otras proteínas virales a la cápsida.

1.2.2 Factores del huésped implicados en el ensamblaje de la cápsida: chaperonas

Las chaperonas están presentes en todas las células y su principal función es ayudar en el plegamiento, ensamblaje y/o transporte de otras proteínas (Leidig *et al.*, 2013; Nicoll *et al.*, 2006). En infecciones virales previenen asociaciones incorrectas y no específicas durante la síntesis de proteínas (Flint *et al.*, 2009) un proceso frecuente en el citoplasma aglomerado del huésped. La primera chaperona descrita fue el producto del gen *groEL* de *E. coli*, indispensable para la replicación de los bacteriófagos T4 y λ ya que intervienen en el correcto plegamiento de la proteína de la cápsida (Ang *et al.*, 2000). Muchos virus codifican para sus propias chaperonas, como la proteína L4 de adenovirus, que facilita el plegamiento de las subunidades monoméricas que conforman el hexón o su ensamblaje en trímeros (San Martín, 2012).

1.3 Maduración de la cápsida

Muchas partículas virales son ensambladas en una forma precursora no infecciosa (denominada provirión, precabeza o procápsida) y requieren de un proceso de maduración para convertirse en una partícula infectiva más estable. Este proceso se ha descrito prácticamente en todos los bacteriófagos y virus animales (Veesler y Johnson, 2012). La maduración es un proceso irreversible y suele estar controlada por proteasas cuya acción desencadena importantes cambios conformacionales mas que eliminar ciertos componentes (Steven *et al.*, 2005). Además, los péptidos liberados suelen ser péptidos de fusión y/o con actividad lítica, por lo que este proceso suele ocurrir en el medio extracelular. En virus con envuelta el proceso de maduración se centra en modificaciones post-traduccionales de las glicoproteínas que reconocen a sus receptores, mediante la adición de carbohidratos, lípidos, grupos acetilo, sulfato o fosfato. En algunos virus la maduración implica la formación de enlaces covalentes y/o la adición de proteínas que actúan como “cemento”. La proteasa viral de los herpesvirus se localiza en la procápsida como una proteína de fusión con la proteína de andamiaje; elimina un péptido terminal de la proteína de andamiaje y queda así separada de la cápsida (Cardone *et al.*, 2012).

1.3.1 Proteasas

Las enzimas proteolíticas, proteasas o peptidasas se clasifican en 5 familias dependiendo de su grupo catalítico: serín-proteasas, treonín-proteasas, cisteín-proteasas, aspartato-proteasas y metaloproteasas (Rawlings *et al.*, 2008). Cada familia está formada por subfamilias o clanes,

como resultado de la evolución convergente que ha originado proteasas con distintos plegamientos pero con una disposición conservada de los residuos del centro activo (James, 2006). Las proteasas pueden ser de origen viral como en T4, herpesvirus, adenovirus y picornavirus (Schmidt y Darke, 1997; Tuthill *et al.*, 2010) del huésped (para la hemaglutinina del virus de la gripe, (Bottcher-Friebertshauser *et al.*, 2010), o la propia proteína de la cápsida como nodavirus y tetravirus, (Munshi *et al.*, 1996; Schneemann *et al.*, 1992).

Las proteasas de algunos virus son un potencial blanco en el desarrollo de antivirales. La proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-1), una aspartato-proteasa, es quizás la más conocida (Huang y Chen, 2013) y está relacionada estructuralmente con algunas proteasas celulares como cathepsina D, gastrina y pepsina (James, 2006). La proteasa de HIV-1 es un homodímero (99 aminoácidos cada unidad); el sitio activo se localiza en la interfaz del dímero y está constituido por dos residuos de ácido aspártico aportados por cada subunidad formando motivos Asp-Thr-Gly (Huang y Chen, 2013). La proteasa se expresa formando parte de un precursor proteico de gran tamaño que también contiene a la proteína de la cápsida, y queda incluida en el interior de partículas virales inmaduras (no infectivas), donde posteriormente es activada, autoprocesándose y procesando la poliproteína para dar lugar a las partículas infectivas o maduras (Adamson, 2012; Ganser-Pornillos *et al.*, 2012).

1.4 El virus de la bursitis infecciosa

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae* que agrupa virus RNA de cadena doble (dsRNA) capaces de infectar una gran variedad de especies animales que incluyen vertebrados, moluscos, insectos y rotíferos (Delmas *et al.*, 2012). Los birnavirus comprenden cuatro géneros (Chung y Paetzel, 2013):

- *Avibirnavirus*, que infectan aves y su miembro más representativo es IBDV.
- *Aquabirnavirus*, que infectan peces, moluscos y crustáceos. Entre sus miembros se incluye el virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) que infecta salmones y truchas, el virus de la ascitis de cola amarilla (YAV) que infecta peces de la especie *Seriola quinqueradiata* y el virus Tellina-1 (TV-1) que infecta moluscos.
- *Entomobirnavirus*, que infectan insectos y su principal representante es el virus X de la *Drosophila* (DXV).
- *Blosnavirus* cuyo único representante es el virus del pez de la cabeza de serpiente (*Channa maculata*) (BSNV).

1.4.1 La bursitis infecciosa

IBDV es el agente causal de la bursitis infecciosa que afecta fundamentalmente a individuos jóvenes de gallina doméstica (*Gallus gallus*), provocando la destrucción de células linfoides en la bolsa de Fabricio, un órgano linfoide donde se produce la maduración de linfocitos B y que solo está presente en aves (Kaufer y Weiss, 1980). Fue detectada inicialmente en granjas avícolas en 1962 cerca de un pueblo llamado Gumboro, ubicado al sur del estado Delaware en EEUU, por lo que también es conocida como la enfermedad de Gumboro (Cosgrove, 1962). La infección es transmitida por vía oral, principalmente entre individuos de 3 a 6 semanas de edad, y es muy resistente a los métodos tradicionales de desinfección como la inactivación química o calórica, por lo que la vacunación es el único método de control eficiente (Negash *et al.*, 2004).

Esta enfermedad posee un alto impacto económico en la industria avícola ya que produce un síndrome de inmunosupresión en los individuos afectados, que incrementa su susceptibilidad a infecciones por otros agentes patógenos; además la capacidad para una respuesta efectiva frente a la vacunación contra otros agentes infecciosos está muy reducida (Muller *et al.*, 2003). Dependiendo de la virulencia de la cepa infectiva, principalmente determinada por modificaciones en la secuencia de la proteína de la cápsida y de la polimerasa viral (Escaffre *et al.*, 2013), la mortalidad puede alcanzar valores de hasta un 100% en cepas que afectan a pollos jóvenes, mientras que en aquellos que afectan individuos adultos, la enfermedad provoca una disminución importante en los niveles de producción de cantidad y calidad de huevos y carne (Kaufer y Weiss, 1980).

El uso intensivo de vacunas atenuadas puede provocar la aparición de cepas variantes e hipervirulentas de IBDV (Murphy *et al.*, 1999), por lo que están siendo evaluadas nuevas estrategias de vacunación que evitan el uso de patógenos vivos, tales como el empleo de vacunas de DNA que incluyen la secuencia de la proteína de la cápsida o de la poliproteína viral completa (Chang *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 1999; Mahgoub *et al.*, 2012; Rong *et al.*, 2007), o la utilización de vectores virales u otros virus aviares (Bublott *et al.*, 2007; Martinez-Torrecuadrada *et al.*, 2003; Pradhan *et al.*, 2012; Tsukamoto *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2002). Asimismo, el desarrollo de antivirales se presenta como otra alternativa para el control de la enfermedad, pero para ello es necesario tener un conocimiento detallado del ciclo viral, ya sea inhibiendo la salida o entrada de los virus, el procesamiento o producción de proteínas, el ensamblaje o maduración de la cápsida, el empaquetamiento del material genético, o su paso por los diferentes compartimentos celulares como en los casos del HIV (Root *et al.*, 2001), virus de la gripe (Brancato *et al.*, 2013) y de los herpesvirus (Choi *et al.*, 2010).

1.4.2 Organización genómica de IBDV

El genoma de IBDV está organizado en dos segmentos de dsRNA, el segmento A, de 3,2 kb, y el segmento B, de 2,8 kb, flanqueados por regiones no codificantes (UTRs) en ambos extremos (Figura 2) (Muller y Nitschke, 1987; Muller *et al.*, 1979). IBDV es un virus poliploide que encapsida hasta cuatro segmentos de genoma, siendo más infectivas las partículas que contienen un mayor número de segmentos (Luque *et al.*, 2009a). El dsRNA en el interior de la cápsida forma complejos ribonucleoproteicos (RNPs) con la proteína VP3 a lo largo del segmento, y con la polimerasa viral VP1, que se encuentra soluble y unida a los extremos 5' (denominada VPg) (Hjalmarsson *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 2009b).

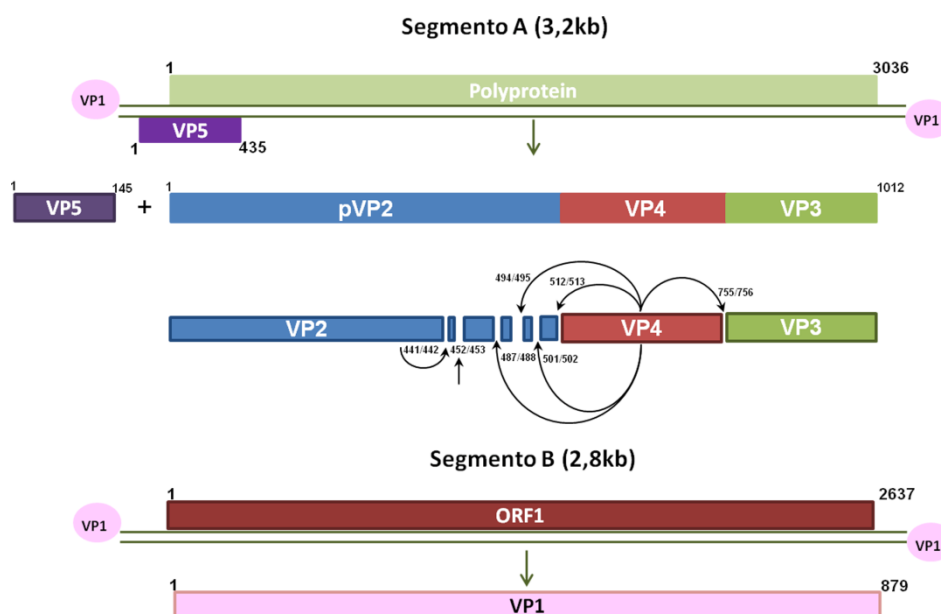


Figura 2. Organización genómica de IBDV. El segmento A contiene dos ORFs, que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral. La poliproteína es procesada cotraduccionalmente por la proteasa viral VP4 dando lugar a las proteínas pVP2, VP4 y VP3. El extremo carboxilo terminal de pVP2 es procesado en las posiciones indicadas por diferentes factores virales y celulares. El segmento B contiene una única ORF que codifica la RdRp del virus, VP1, que cataliza la transcripción y la replicación del genoma.

El **segmento A** contiene dos fases abiertas de lectura (ORF, *open reading frame*) parcialmente solapantes. La primera de ellas codifica la proteína VP5 (145aa, 17 kDa), una proteína citolítica de membrana no esencial para la replicación del virus en cultivos celulares (Mundt *et al.*, 1997), implicada en la liberación de la progenie viral *in vivo* (Lombardo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009), y en la inhibición de la apoptosis en estadios iniciales de la infección, mediante la interacción con canales aniónicos dependientes de voltaje (Li *et al.*, 2012; Liu y Vakharia, 2006; Wei *et al.*, 2011). La segunda ORF codifica una poliproteína de 1012 aa (107 kDa) que se autoprocresa proteolíticamente de manera cotraducciona mediante la acción de la proteasa viral VP4 (244 aa,

25 kDa) para dar lugar a las proteínas pVP2 (542 aa, 54 kDa), VP4 y VP3 (256 aa, 28 kDa) (Kibenge *et al.*, 1988; Luque *et al.*, 2009a).

El **segmento B** contiene una única ORF que codifica la RNA polimerasa-RNA dependiente (RdRp) VP1 (879 aa, 97 kDa), (Morgan *et al.*, 1988; Muller y Nitschke, 1987). Al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, VP1 cataliza tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007; Spies *et al.*, 1987).

1.4.3 Componentes estructurales de IBDV

La partícula infectiva de IBDV carece de envuelta lipídica. Los componentes mayoritarios del virión son VP2 (junto con una pequeña cantidad de pVP2) y VP3; la proteasa VP4 y la polimerasa VP1 se encuentran en menor proporción (Dobos *et al.*, 1979) (Figura 3A). La cápsida de IBDV presenta un diámetro externo de ~70 nm y está formada únicamente por trímeros de pVP2/VP2 (Coulibaly *et al.*, 2005; Saugar *et al.*, 2005) siguiendo una topología molecular basada en un número de triangulación $T=13$ *levo* (Böttcher *et al.*, 1997; Castón *et al.*, 2001) (Figura 3B y C). Considerando la geometría de la cápsida y las interacciones entre los trímeros de VP2 se pueden distinguir cinco clases de trímeros (a-e), que se organizan formando 20 pentámeros y 120 hexámeros (Figura 3C). La estequiometría de la partícula viral incluye 780 copias de pVP2/VP2, ~450 copias de VP3, ~12 copias de VP1 y un número variable, entre 30-60 copias, de VP4 (Luque *et al.*, 2009a). En el virión maduro, el dsRNA viral se encuentra unido a VP1 en sus extremos 5' (Xu *et al.*, 2004) y recubierto por VP3, formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) (Figura 3D) (Luque *et al.*, 2009b).

La proteína de la cápsida se sintetiza como un precursor, **pVP2** (512 aa), que es procesado postraduccionalmente en su extremo carboxilo terminal para dar lugar a la forma madura, VP2 (441 aa). Esta maduración está mediada por varias proteasas virales y celulares. Además de la diana Ala-Ala del enlace peptídico 512-513, la proteasa viral VP4 puede llevar a cabo el procesamiento en las dianas secundarias 501-502, 494-495 y 487-488 (Sanchez y Rodriguez, 1999). La enzima aminopeptidasa sensible a puromicina (PurSA), presente en las células susceptibles a infección por IBDV, proteoliza el enlace entre los residuos Arg452-Arg453 generando una forma intermedia de 452 aa (Irigoyen *et al.*, 2012). El procesamiento final entre los residuos Ala441-Phe442 lo lleva a cabo la propia VP2 mediante una actividad autoproteolítica *in cis* a través del residuo catalítico Asp431 (Irigoyen *et al.*, 2009). Los pequeños péptidos liberados durante la maduración, que dan cuenta de un tamaño total de 7.4 kDa y están constituidos por varias hélices α , permanecen asociados a la partícula viral (Da

Costa *et al.*, 2002), y están implicados en la desestabilización de la membrana celular para facilitar la entrada del virus (Chevalier *et al.*, 2005; Galloux *et al.*, 2007).

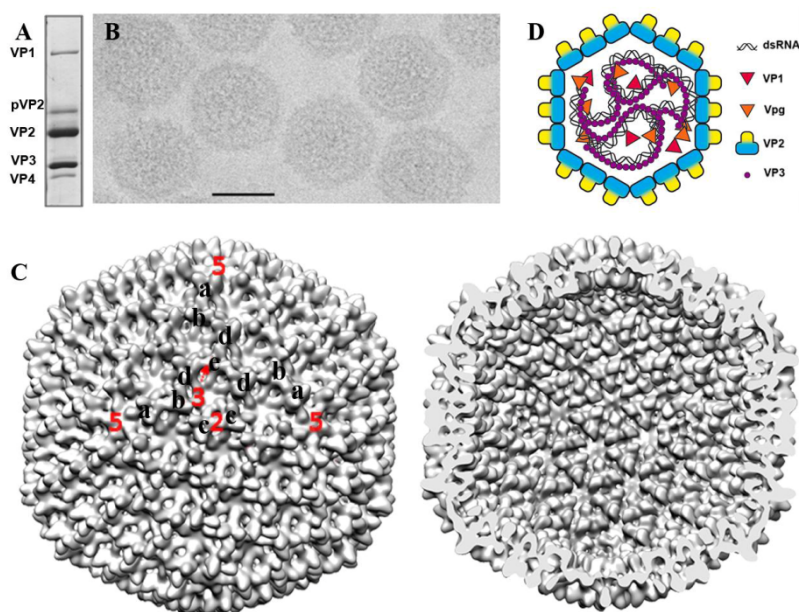


Figura 3. Estructura de la cápsida de IBDV. (A) Análisis mediante SDS-PAGE de una purificación de viriones de IBDV donde se muestran las bandas correspondientes a las proteínas estructurales. (B) Imagen de criomicroscopía electrónica de viriones de IBDV. (C) Estructura tridimensional de la superficie externa (izquierda) e interna (derecha) de la partícula de IBDV indicando los ejes de simetría de orden 2, 3 y 5 así como los 5 tipos de trímeros de VP2 (a-e). (D) Modelo de la partícula de IBDV que encapsida cuatro RNPs formados por el dsRNA, VP3 y VP1 en su forma VPg. Adaptado de Luque *et al.*, 2007 y Luque *et al.*, 2009b

La estructura atómica de **VP2** fue resuelta por cristalografía de rayos X de subpartículas virales (SVPs), unas cápsidas icosaédricas con simetría T=1 constituidas por 60 copias de VP2 (PDBs 1wcd, 2gsy y 2df7, (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). VP2 está organizada en tres dominios denominados protuberante (*protruding*, P), armazón (*shell*, S) y basal (*base*, B). Los dominios P y S son barriles β orientados de forma perpendicular (P) y tangencial (S) a la superficie de la cápsida. El dominio B comprende los extremos amino y carboxilo terminales de VP2, ambos organizados en una sucesión de hélices α dispuestas hacia el interior de la partícula viral (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006) (Figura 4). La unidad básica del ensamblaje de IBDV es un trímero de VP2. Este trímero está estabilizado por grandes superficies de contacto a lo largo de los dominios S y B y reforzada por la coordinación de un ion Ca^{2+} con dos residuos ácidos aportados por el dominio P de cada monómero. La estructura de la cápsida se encuentra estabilizada mediante contactos laterales intertriméricos entre los dominios S y B, y por el intercambio molecular (*molecular swapping*) de una hélice α de cada monómero entre trímeros adyacentes (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006).

La proteína **VP3** está implicada en numerosos procesos esenciales en el ciclo viral. VP3 es una proteína de andamiaje, necesaria para el correcto ensamblaje de la partícula viral; esta función está mediada por interacciones electrostáticas entre los residuos de carácter ácido de su extremo carboxilo terminal con la hélice anfipática $\alpha 5$ que comprende los residuos 443-452 en el extremo carboxilo terminal de pVP2 (Figura 5A) (Oña *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005).

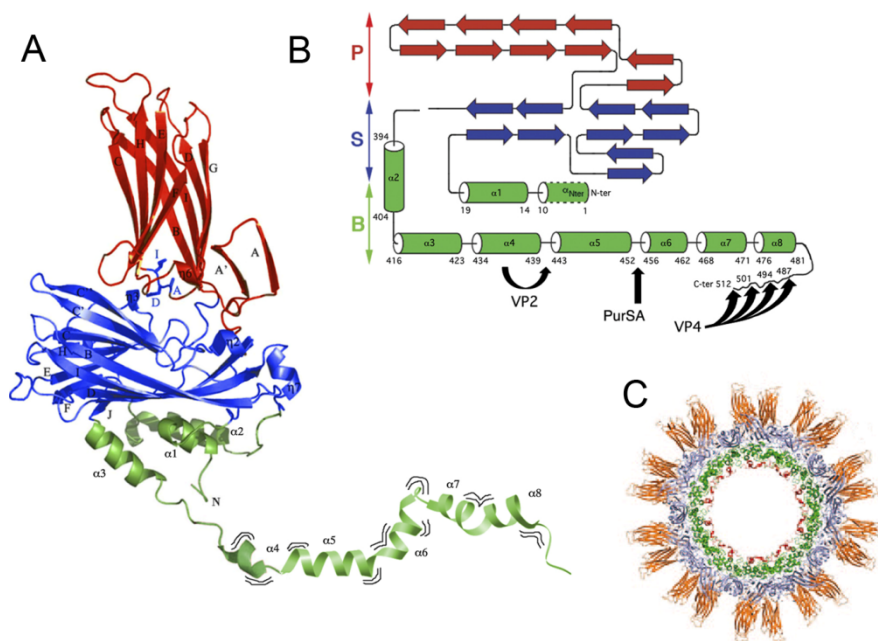


Figura 4. Estructura de VP2. (A) Estructura atómica de VP2 de 452 residuos (2gsy) manualmente unida a la región carboxilo terminal de pVP2 determinado por NMR (Galloux *et al.*, 2007). En rojo, azul y verde se indican los motivos P, S y B respectivamente. (B) Diagrama topológico de VP2 donde se indican los elementos de estructura secundaria. Los dominios P y S están constituidos por barriles β , mientras que el dominio B está compuesto por hélices α ; las flechas indican los sitios de procesamiento de la región carboxilo terminal de pVP2 por parte de la proteasa viral VP4, la aminopeptidasa celular resistente a puromicina (PurSA) y la propia VP2 (C) Sección transversal de la SVP T=1 de VP2 (452 aa) donde se muestra la disposición de los dominios y las interacciones intermoleculares de las regiones S y B. Adaptado de Garriga *et al.*, 2006 e Irigoyen *et al.*, 2012.

VP3 tiene la capacidad de interactuar consigo misma formando dímeros y oligómeros (Figura 5B y C) (Casañas *et al.*, 2008; Tacken *et al.*, 2002), con VP1 a través de su región carboxilo terminal (Garriga *et al.*, 2007; Maraver *et al.*, 2003a; Tacken *et al.*, 2000), funcionando como un activador transcripcional (Garriga *et al.*, 2007), y con el dsRNA constituyendo las RNPs virales (Luque *et al.*, 2009b). El complejo formado por VP3, VP1 y el dsRNA es transcripcionalmente activo (Luque *et al.*, 2009b). VP3 interactúa con el dsRNA a través de residuos básicos agrupados en dos regiones de la superficie de la proteína (residuos Lys99, Arg102, Lys105 y Lys106; y Arg159, Arg168, His198 y Arg200) (Casañas *et al.*, 2008; Luque *et al.*, 2009b; Valli *et al.*, 2012). Debido a estas características, VP3 suprime el silenciamiento por RNAs mediante la unión a fragmentos de dsRNA (Valli *et al.*, 2012), e impide la fosforilación de la proteína

quinasa dependiente de dsRNA (PKR) y del factor IF2 α , siendo responsable de la actividad antiapoptótica (Busnadiego *et al.*, 2012).

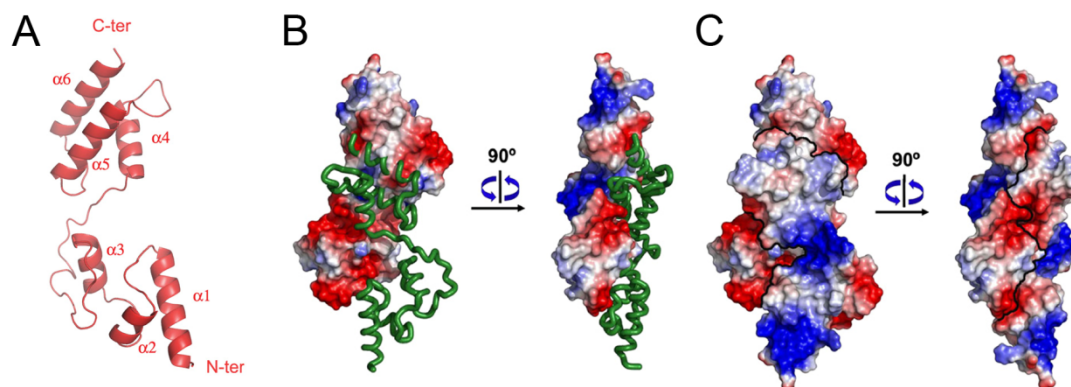


Figura 5. Estructura de VP3. (A) Estructura atómica de la región central de VP3 donde se aprecian los dos dominios helicoidales unidos entre sí por un bucle flexible (B) Dos vistas del dímero de VP3 donde se muestra la superficie de potencial electrostático de una subunidad y el esqueleto de la cadena principal en la segunda subunidad (verde) (C) Dos vistas de la superficie del dímero de VP3. Adaptado de Casañas *et al.* 2008.

La RdRp viral, VP1, se encuentra tanto soluble en la partícula viral como asociada covalentemente al genoma en forma de VPg. La resolución de su estructura atómica mostró una permutación de los motivos que componen el dominio catalítico (dominio de la palma) que la diferencia de las RdRps de otros virus dsRNA (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009). VP1 se autoguanidila y actúa como cebador para la síntesis de RNA sin necesidad de otras proteínas virales (Dobos, 1993; Luque *et al.*, 2009b; Pan *et al.*, 2007; Shwed *et al.*, 2002; Spies y Muller, 1990; Spies *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 2004). Tras este proceso, VP1 permanece covalentemente unida a los extremos 5' del RNA viral de nueva síntesis (Xu *et al.*, 2004).

1.4.4 La proteasa viral VP4

VP4 es una serín endoproteasa no canónica cuyo carboxilo terminal presenta una alta homología con el dominio proteasa de las Lon proteasas bacterianas pero carece del dominio ATPasa característico de las mismas (Birghan *et al.*, 2000; Lejal *et al.*, 2000). Su centro activo está formado por una díada catalítica constituida por la Ser 140 y la Lys 180 (residuos 652 y 692 en la poliproteína), en lugar de la tríada serina-histidina-aspartato de otras serinproteasas (Ekici *et al.*, 2008). VP4 es capaz de procesar a la poliproteína viral tanto en *cis* como en *trans* en motivos Ala-Ala de manera autocatalítica y cotraduccional (Birghan *et al.*, 2000; Lejal *et al.*, 2000; Sanchez y Rodriguez, 1999). Hasta la fecha se han descrito las estructuras atómicas de la VP4 de BSNV [PDB nº 2gef, (Feldman *et al.*, 2006)], IPNV [2pnl, (Lee *et al.*, 2007)], TV-1 [3p06, (Chung y Paetzel, 2011)], y YAV [4izj, (Chung y Paetzel, 2013)]. A pesar de la baja

homología entre sus secuencias (~20%), sus estructuras están altamente conservadas, permitiendo distinguir claramente dos dominios: un dominio amino terminal con numerosas láminas β y otro carboxilo terminal rico en hélices α (Figura 6).

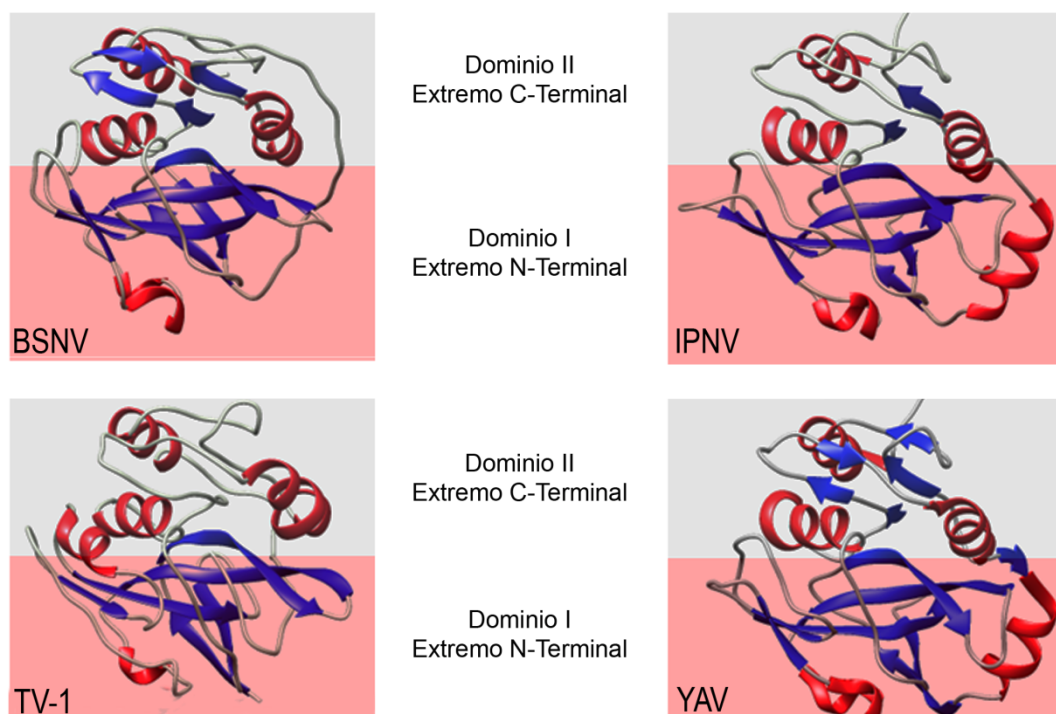


Figura 6. Estructura de las proteasas de birnavirus. Estructuras atómicas de las cuatro proteasas de birnavirus descritas hasta la fecha, donde se aprecia la existencia de un dominio amino terminal rico en láminas β y el dominio carboxilo terminal rico en hélices α .

El centro activo de las estructuras de VP4 se encuentra en su superficie formando un bolsillo o hendidura (Figura 7A), donde los residuos catalíticos Ser/Lis, además de estar dispuestos prácticamente en la misma posición, están muy próximos (a una distancia igual a un enlace de hidrógeno). Los residuos catalíticos están rodeados por Pro, Thr y Gly (Figura 7B) y ayudan a estabilizar el intermediario tetraédrico cargado negativamente que se forma durante el ataque nucleofílico de la Ser sobre los enlaces escindibles de la poliproteína. También coordinan la donación de hidrógenos a la base general Lys y finalmente posicionan y estabilizan la poliproteína durante su procesamiento (Chung y Paetzel, 2011; Chung y Paetzel, 2013; Feldman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

VP4 es un componente estructural del virión aunque su encapsidación es altamente variable (Luque *et al.*, 2009a). En células infectadas con IBDV se han observado, además de las cápsidas T=13I, dos tipos de estructuras helicoidales denominadas tubos tipo I (~70 nm de diámetro) y tubos tipos II (~25 nm de diámetro) constituidos por pVP2 y VP4 respectivamente (Granzow *et al.*, 1997). A diferencia de los tubos tipo I, que han sido observados en células infectadas con

distintos birnavirus, los tubos tipo II sólo se han detectado en el citoplasma en infecciones de IBDV (Granzow et al., 1997; Ozel y Gelderblom, 1985; Teninges et al., 1979). A pesar de los numerosos estudios estructurales de alta resolución de VP4 de distintos birnavirus, se desconoce la estructura y función de los tubos de VP4 en células infectadas con IBDV. Recientemente se ha descrito que VP4 interacciona con GILZ (del inglés *Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper*) en células HEK293T y DF-1, suprimiendo la respuesta innata celular de activación de la vía del interferón tipo 1 (INF-1) ante la infección viral (Li et al., 2013).

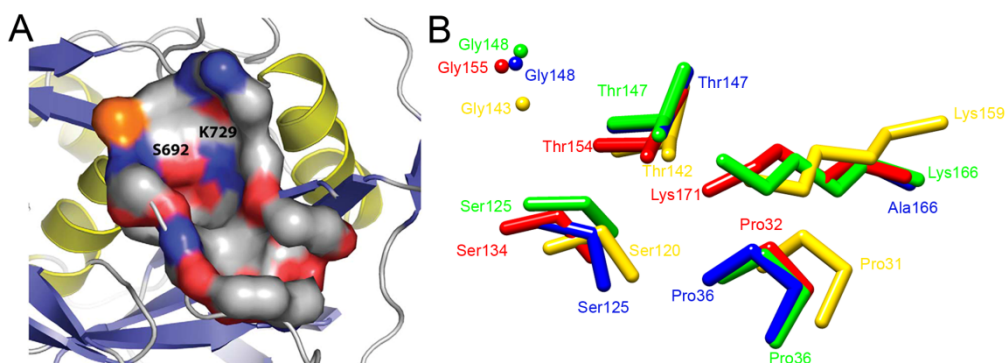


Figura 7. Sitio activo de la proteasa de birnavirus. (A) Representación de la superficie molecular de la hendidura del centro activo de la VP4 de BSNV que corresponde al sitio de unión del sustrato. Se indican los residuos catalíticos Ser692 y Lys729. Los átomos de oxígeno, nitrógeno y carbono están representados en color rojo, azul y blanco respectivamente. En naranja se señala el grupo sulfuro de la Ser692 (tomado de Feldman *et al.*, 2006) (B) Superposición de los residuos importantes del sitio activo de las cuatro VP4 de birnavirus descritas hasta la fecha. Se observa que los residuos catalíticos están dispuestos prácticamente en las mismas posiciones dentro del bolsillo catalítico. Código de colores: rojo, BSNV (2gef); azul, IPNV (2pnl); amarillo, TV-1 (3p06); verde YAV (4izj).

1.4.5 Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV

Los mecanismos moleculares que controlan el polimorfismo estructural de la cápsida de IBDV han sido caracterizados a partir de sistemas de expresión recombinantes basados en baculovirus (rBVs) y en el virus vaccinia (rVV) (Irigoyen *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2007; Oña *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005). La expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante un rVV da lugar a VLPs estructuralmente idénticas a la cápsida del virión formadas por pVP2, VP2 y VP3 (Castón *et al.*, 2008). En este contexto celular el procesamiento de la poliproteína es completo y por tanto se generan correctamente todas las proteínas estructurales (Fernandez-Arias *et al.*, 1998). La co-expresión del rVV que expresa la poliproteína con un rVV que expresa VP1 da lugar a VLPs que incorporan VP1 (Lombardo *et al.*, 1999). Sin embargo, la expresión de la poliproteína en células de insecto mediante el uso de rBVs da lugar mayoritariamente a tubos rígidos de ~50 nm de diámetro con un ordenamiento helicoidal (Chevalier *et al.*, 2002; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000), similares a los observados en células infectadas con IBDV a tiempos largos post-infección (Granzow *et al.*, 1997). La baja eficiencia de formación de cápsidas en este sistema se atribuye, entre otros

factores, a la ausencia o al funcionamiento deficiente en células de insecto de un factor necesario para la formación de pentámeros a partir de pVP2, la proteasa celular PurSA (Irigoyen *et al.*, 2012), que además tiene como consecuencia el procesamiento proteolítico del dominio carboxilo terminal de VP3 (Maraver *et al.*, 2003b), fundamental para su función de andamiaje.

La expresión de VP2 mediante rBVs en ausencia de otras proteínas virales da lugar a la formación de SVPs de ~26 nm de diámetro y geometría T=1 (Figura 8) (Castón *et al.*, 2001), donde los trímeros de VP2 están agrupados exclusivamente en pentámeros. La expresión en el mismo sistema de la forma precursora pVP2 da lugar a estructuras tubulares poco regulares donde los trímeros de proteína siguen un ordenamiento hexagonal, indicando que el extremo carboxilo terminal de pVP2 es el responsable del control del polimorfismo estructural inherente a esta proteína. Mediante el estudio de una batería de rBVs que expresan versiones de pVP2 con diferentes extensiones de su extremo carboxilo terminal, desde pVP2 (512 aa) hasta la forma madura VP2 (441 residuos) se determinó que el interruptor molecular que dirige el ensamblaje de trímeros en hexámeros o pentámeros está localizado en la hélice anfipática $\alpha 5$, que comprende la región 443GFKDIIRAIR452 de pVP2 (Galloux *et al.*, 2007; Saugar *et al.*, 2005).

Sin embargo, este elemento por sí solo no es suficiente para el ensamblaje de cápsidas T=13. Aunque las formas de longitud intermedia VP2-456 y VP2-466 pueden ensamblarse tanto en pentámeros (SVPs T=1) como en hexámeros (estructuras tubulares), éstos no se combinan de manera eficiente para la producción de cápsidas T=13; para ello se deben expresar con un *tag* de His unido covalentemente a su extremo amino terminal, proteínas denominadas HT-VP2-456 y HT-VP2-466 (Saugar *et al.*, 2005); el tag de His puede ser sustituido por el extremo carboxilo terminal de VP3 (Saugar *et al.*, 2010). La función de andamiaje de VP3 está mediada por interacciones electrostáticas de sus residuos ácidos Asp242 y Asp245 con los residuos básicos Lys445 y Arg449 de la hélice $\alpha 5$ anfipática de pVP2 (Saugar *et al.*, 2010).

Los numerosos estudios realizados para caracterizar las interacciones entre los diferentes componentes de IBDV han permitido establecer un modelo de ensamblaje de la partícula viral. En IPNV se ha caracterizado un estadio morfogenético que implica la formación de una procápsida esférica (Villanueva *et al.*, 2004). A partir de un rBV basado en el vector AcMY-Poly (Martínez-Torrecedrera *et al.*, 2000) se han caracterizado parcialmente estructuras de morfología similar a la procápsida. En las primeras etapas del ensamblaje la interacción electrostática entre los extremos carboxilo terminal de pVP2 y VP3 daría lugar a una partícula con una doble capa proteica compuesta por VP3 recubriendo la superficie interna de la cápsida. Esta interacción retardaría el procesamiento del extremo carboxilo terminal de VP2 y por tanto

permitiría el ensamblaje de hexámeros. Aquellas moléculas de pVP2 que no establecen interacciones intensas con VP3 serían susceptibles de ser proteolizadas en la posición 452-453

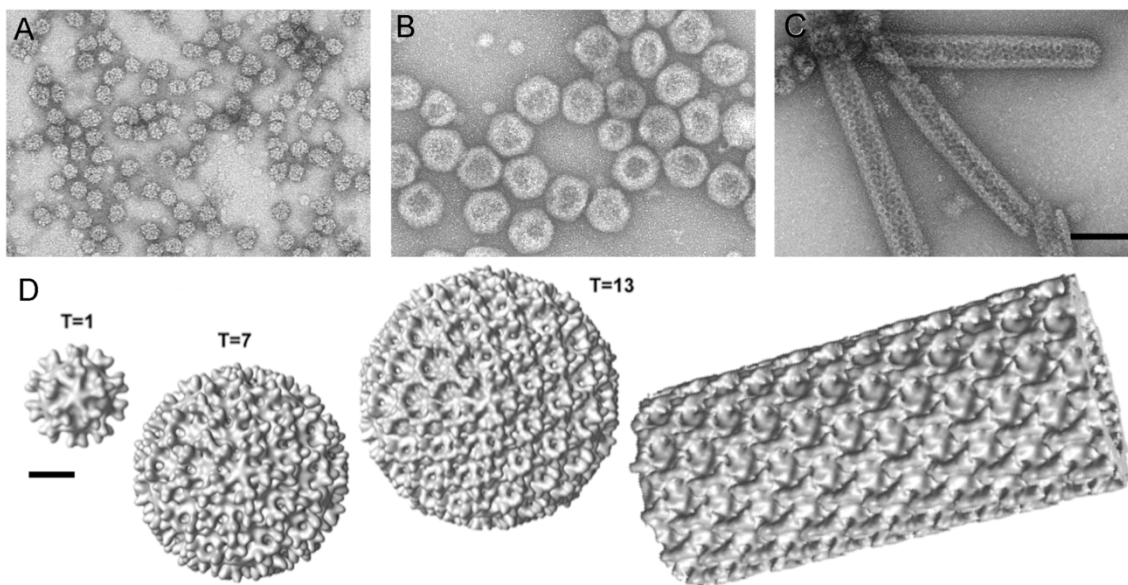


Figura 8. Estructuras derivadas de la expresión de formas de pVP2 con extremos C-terminales de distinta longitud. (A-C) Imágenes de tinción negativa de las diferentes estructuras derivadas de la expresión de pVP2. La barra de escala representa 100 nm. (A) La expresión de un rBV que expresa la forma madura de VP2 (441 aa) da lugar a cápsidas T=1, producto del ensamblaje de los trímeros de VP2 en pentámeros. (C) La expresión en el mismo sistema de la proteína precursora completa, pVP2 (512aa), da lugar a ensamblados tubulares con un patrón hexagonal. (B) Para que pentámeros y hexámeros se combinen de forma eficiente en cápsidas T=13 se requiere la expresión de formas de pVP2 de longitud intermedia (456-476 aa) fusionadas a un *tag* de His en su extremo amino terminal. (D) Reconstrucciones tridimensionales de los diferentes ensamblados descritos a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. La barra de escala representa 10 nm.

en un proceso mediado por la proteasa PurSA, dando lugar a pentámeros, que actuarían como centros nucleadores del ensamblaje (Figura 9) (Irigoyen *et al.*, 2012). Esta hipótesis es consistente con la estequiometría de moléculas de VP3 incorporadas por partícula viral, ~450 copias, implicando la presencia de una molécula de VP3 por cada molécula de pVP2, excepto en los trímeros pentaméricos “a” y los trímeros inmediatamente adyacentes “b” (Luque *et al.*, 2009a). Una vez ensamblada la procápsida, la interacción con VP3 se debilitaría, favoreciendo el procesamiento del extremo carboxilo terminal de pVP2 y resultando en la maduración total de la partícula

La expresión de la poliproteína de IBDV en células de insecto da lugar a diversos ensamblados que, en algunos casos, no se relacionan con las estructuras nativas observadas en la células aviares infectadas por IBDV. Sin embargo, estos sistemas de expresión simple también han aportado una información valiosa sobre el ensamblaje y maduración de la cápsida de IBDV. Como continuación de estudios previos de nuestro grupo, el trabajo contenido en el presente trabajo ha abordado la caracterización estructural y funcional de un intermediario de la

procápsida de IBDV constituido por precursores proteicos, así como de los tubos helicoidales formados por la proteasa VP4. La obtención de estas estructuras ha sido posible a partir de rBV y de sistemas de expresión basados en *E. coli*.

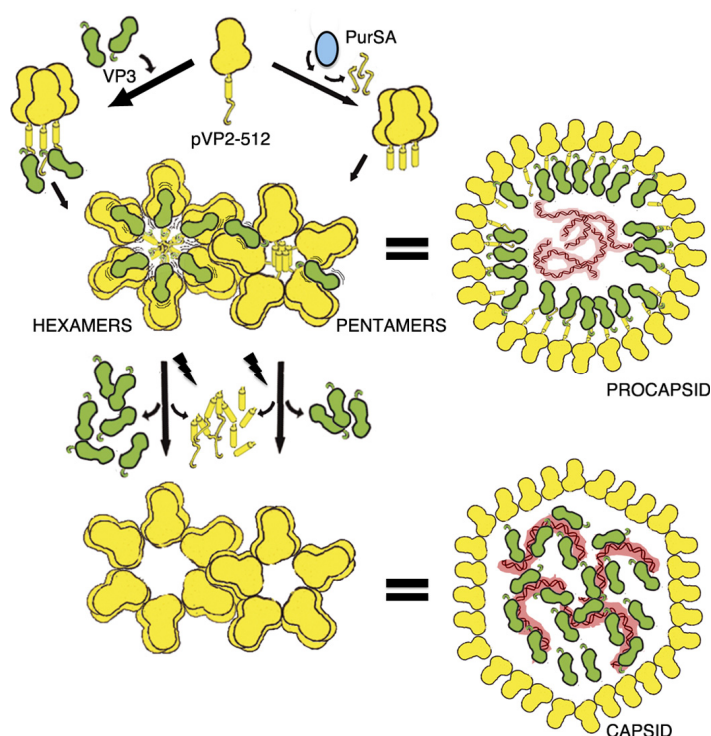


Figura 9. Modelo propuesto para el ensamblaje de IBDV. La proteína de la cápsida de IBDV es sintetizada como un precursor, pVP2 (512aa, amarillo). El procesamiento del carboxilo terminal (representado como un cilindro con cola) de dicho precursor por parte de la proteasa viral, la proteasa celular PurSA (azul) y la propia pVP2, da lugar a la proteína madura que constituye al virus. La proteína VP3 (verde) posee funciones de andamiaje e interacciona con el extremo carboxilo terminal de pVP2 coordinando el ensamblaje. Un rápido procesamiento de pVP2 por parte de PurSA favorece su ensamblaje en pentámeros, mientras que la interacción de VP3 con pVP2 garantiza que dicho procesamiento sea lento lo que favorece el ensamblaje de los trímeros en hexámeros. Irigoyen et al., 2012.

2.Objetivos

El programa genético de IBDV está optimizado para que la mayor parte de los ensamblados macromoleculares que se forman en células aviares infectadas sean las cápsidas icosaédricas T=13 del virión y unas estructuras helicoidales constituidas por la proteasa viral VP4, denominados tubos de tipo II. El virus IBDV constituye, por tanto, un excelente sistema para analizar los mecanismos que controlan la dinámica y ensamblaje de los complejos multiproteicos y/o ácidos nucleicos. La expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero usando un virus vaccinia recombinante da lugar a la formación de pseudo-partículas virales (VLPs) similares a los viriones de IBDV, además de ensamblados helicoidales rígidos constituidos por la forma precursora de pVP2 (tubos de tipo I). Sin embargo, el sistema del baculovirus recombinante en células de insecto, y dependiendo del vector de transferencia empleado, da lugar a ensamblados heterogéneos aberrantes y, en general, es deficiente en la producción de VLPs. A pesar de estos inconvenientes, ambos sistemas han proporcionado una valiosa información respecto a los ensamblados macromoleculares asociados a IBDV. En el presente trabajo hemos utilizado dos vectores de transferencia para baculovirus, pFastBac y pAcYM1, para analizar los ensamblados resultantes de la expresión del gen de la poliproteína de IBDV. Además, hemos analizado las estructuras tubulares constituidas por la proteasa viral VP4.

Los objetivos del presente trabajo se centran en la caracterización estructural y funcional de dos ensamblados naturales constituidos por las proteínas estructurales de IBDV:

1. Análisis estructural y bioquímico de la procápsida de IBDV. Modulación de la actividad de VP4 para la generación de los precursores estructurales de la procápsida.
2. Reconstrucción tridimensional subnanométrica de la estructura helicoidal nativa de VP4 a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. Obtención de un modelo pseudo-atómico de VP4 usando técnicas de modelado comparativo y ajuste flexible.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Células procariotas

La amplificación y mantenimiento de plásmidos recombinantes fue realizada en la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (Raleigh *et al.*, 2002); esta cepa también fue utilizada para las infecciones con el fago T4. Para la generación de bácmidos recombinantes se utilizó la cepa DH10-Bac (Luckow *et al.*, 1993). Para la expresión y purificación de proteínas a partir de bacterias recombinantes se utilizó la cepa de *E.coli* BL21(DE3)pLysS que contiene al lisógeno del fago λ DE3 el cual porta el gen de la RNA polimerasa de T7 regulado por el gen *lac*.

3.1.2 Células eucariotas

La expresión de baculovirus recombinantes (rBVs) se realizó en células de insecto High Five H5 (*Invitrogen*) derivadas de *Trichoplusia ni* (ATCC, CRL-1711). Las infecciones con IBDV fueron llevadas a cabo en la línea celular QM7 derivada de fibroblastos musculares de *Coturnix japonica* (codorniz japonesa) (ATCC, CRL-1962) (Antin y Ordahl, 1991). Para la infección con virus vaccinia recombinantes (rVVs) se utilizó la línea celular de mamífero BSC-40, derivada de células epiteliales renales de *Cercopithecus aethiops* (ATCC, CRL-2761) (Brockman y Nathans, 1974).

Las células H5 fueron cultivadas a 28 °C en medio TC-100 (*GIBCO-BRL*) suplementado con suero fetal bovino (FCS, *Sigma*) al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml) y fungizona (1 μ g/ml). Los cultivos celulares de QM7 y BSC40 fueron mantenidos a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman, 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml), fungizona (1 μ g/ml) y aminoácidos no esenciales.

3.1.3 Plásmidos

La generación de rBVs se realizó a partir de los plásmidos pFastBac1 y pFastBacHT (*Invitrogen*), así como del plásmido pAcYM1 (Matsuura *et al.*, 1987) proporcionado por INGENSA (Madrid). En estos plásmidos los genes heterólogos se encuentran bajo el control del promotor de la poliedrina y poseen sitios específicos para la transposición del gen recombinante en el bácmido. El plásmido pFastBacHT incorpora además una cola (*tag*) de seis His (HT) y un segmento peptídico espaciador del extremo amino terminal de la proteína recombinante.

Los vectores pFastBac-Poly, utilizado como base para la generación del rBV-Poly-R505H, y pAcYM1-Poly han sido descritos anteriormente en trabajos del laboratorio (Martinez-Torrecuadrada *et al.*, 2000; Sanchez y Rodriguez, 1999). La secuencia de VP4 fue extraída a partir del vector pFastBac-Poly para el clonaje en pRSETB (*Invitrogen*), pFastBac1 y pFastBacHT.

3.1.4 Virus

Las infecciones con IBDV se realizaron con la cepa *Soroa* (Lombardo *et al.*, 1999) adaptada a cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo.

La generación de rBVs se realizó a partir de la cepa BV FastBac (*Invitrogen*).

Los rBV FB-Poly y AcYM1-Poly han sido descritos para la obtención de ensamblados tubulares y esféricos relacionados con IBDV en células de insecto (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000).

El rVV vT7/LacOI/Poly se ha utilizado en el presente trabajo para obtener VLPs de IBDV mediante la expresión inducible de la poliproteína de IBDV en células de mamífero (Lombardo *et al.*, 1999)

El bacteriófago T4 (DSM nº 4505, *DSMZ*) fue proporcionado por el Dr. van Raaij (Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC).

3.1.5 Anticuerpos

Los antisueros de conejo frente a las proteínas VP2 y VP3 han sido descritos previamente (Fernández-Arias *et al.*, 1998; Sánchez y Rodríguez, 1999). El antisuero frente a VP4 fue generado a partir de tres inmunizaciones subcutáneas multifocales a dos conejos NZW hembra.

Se siguió un protocolo de 21 días entre cada inmunización, con sangrado de test 10 días después del segundo recuerdo para probar la efectividad del suero generado. Previo a la inmunización primaria también se realizó una extracción de sangre para obtener el suero preinmune. En la primera inmunización se inyectó a cada conejo un total de 500 µg de VP4 en 1 ml de emulsión con Adyuvante Completo de Freund, en relación 1:1 y repartido en 6-8 puntos. Al cabo de 21 y 42 días se realizaron la segunda y tercera inmunización, inyectando 250 µg de proteína en 1 ml de emulsión con Adyuvante Incompleto de Freund en relación 1:1. Después de comprobar que el suero era positivo frente a VP4, se procedió a realizar la exsanguinación final de los animales previamente anestesiados. Este procedimiento se realizó en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona.

3.2 Manipulación y obtención de vectores recombinantes

3.2.1 Amplificación de fragmentos por PCR

Las reacciones se realizaron en un tampón con 0.2 mM dNTPs, 200 ng de cada cebador, 2 ng de molde de DNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100 y 2 U de la DNA polimerasa Vent (*New England Biolabs*), en un volumen final de 50 µl. El protocolo de amplificación seguido fue el siguiente: 1 min a 94 °C; 30 ciclos de 45 s a 92 °C, 45 s a 60 °C y 90 s a 75 °C y 5 min a 72 °C.

3.2.2 Reacciones de restricción enzimática

Se utilizaron las enzimas de restricción *NdeI*, *KpnI* y *XhoI* de *New England Biolabs*, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.2.3 Reacciones de ligación de fragmentos de DNA

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl en el siguiente tampón: 200 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, utilizando 200 ng/ml del fragmento de DNA y 200 U de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*) durante 16 h a 16 °C.

3.2.4 Generación de plásmidos recombinantes

Se han generado construcciones que expresan la proteína VP4 en presencia y ausencia de un *tag* de His en su extremo amino, tanto en bacterias (con el plásmido pRSETB) como en el sistema basado en baculovirus (pFastBac). Para ello se amplificó por PCR la secuencia de la poliproteína usando como molde el plásmido pFastBac-Poly y los cebadores que se detallan en la Tabla 1. Los productos de PCR fueron purificados e introducidos en los vectores pRSETB, pFastBac1 y pFastBacHT mediante digestión con *KpnI* y *XhoI* de los insertos y los plásmidos; en el caso del pRSETB, el plásmido se digirió con *NdeI*.

Las secuencias de aminoácidos de los dos tags de His introducidos que preceden a la VP4 son para el plásmido pRSET-HTVP4 NH₂-MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDK DRLE-COOH' y para el pFB-HTVP4: NH₂-MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGSGI QRPTSTSSLVAAAFESRACSLE-COOH.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la generación de construcciones de VP4

Oligonucleótido	Secuencia 5'- 3'
5' Nt pRSET-VP4 <i>KpnI</i>	CGCGCTCGAGATGGCCGACAAGGGGTACGAGGTAG
5' Nt FB-VP4 <i>XhoI</i>	CGCGCATATGGCCGACAAGGGGTACGAGGTAG
5' Nt pRSET-HTVP4/FB-HTVP4 <i>XhoI</i>	CGCGCTCGAGGCCGACAAGGGGTACGAGGTAG
3' Ct VP4 <i>KpnI</i>	GCGCGGTACCTAAGCCATGGCAAGGTGGTACTG

**En negrita se indican los ATG de iniciación o el TAA de terminación y se subrayan las dianas de restricción. El cebador 3' es el mismo para las cuatro construcciones.*

Los mutantes puntuales pFastBac-HTVP4-K180A (K692A sobre la poliproteína, sustitución de la Lys 692 del sitio activo por una Ala) y pFastBac-Poly-R505H (sustitución de la Arg 505 por una His en el carboxilo terminal de pVP2) fueron generados mediante mutagénesis digeridas empleando los oligonucleótidos listados en la Tabla 2 y utilizando como molde los plásmidos pFastBac-HTVP4 y pFastBac-Poly respectivamente. La reacción se realizó con 2 mM dNTPs, 0.5 µg/ml de cada cebador, 250 ng de molde de DNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, 0.1 mg/ml de BSA y 5 U de la DNA polimerasa Pfu Turbo (*Agilent Technologies*), en un volumen final de 50 µl. El protocolo de

amplificación seguido fue el siguiente: 1 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 65 °C y 10 min a 72 °C.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la generación de los mutantes puntuales de pFastBac-HTVP4-K180A y pFastBac-Poly-R505H

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'
5'Nt FB-HTVP4-K180A	AGCTTTAGAAGCACCGCGCTCGCTACTGCACAC
3'Ct FB-HTVP4-K180A	GTGTGCAGTAGCGAGCGCGGTGCTTCTAAAGCT
5' Nt FB-Poly-R505H	GCAAGAGCTGCCTCAGGCCA C ATAAGGCAGCTGACTCTCG
3' Ct FB-Poly-R505H	CGAGAGTCAGCTGCCTTAT G AGGCCTGAGGCAGCTCTTGC

*En negrita se señala la mutación introducida

3.2.5 Generación de baculovirus recombinantes

Los rBVs fueron obtenidos según el sistema Bac-to-Bac de *Invitrogen*. Este sistema se basa en la transposición del gen recombinante en el genoma infectivo del baculovirus contenido en un vector (bácmido) que es propagado en la cepa de *E. coli* DH10-Bac (Luckow *et al.*, 1993). Una vez clonada la secuencia de interés en un vector pFastBac, éste es purificado e introducido por transformación en la cepa DH10-Bac, donde tiene lugar la transposición del gen de interés dentro del genoma del bácmido. Los bácmidos son purificados de las bacterias, seleccionados y analizados por PCR para comprobar la ausencia de bácmido no recombinante. Los bácmidos seleccionados son transfectados en células H5 dando lugar a un stock primario de baculovirus infectivo, el cual es amplificado mediante la infección de células H5 con el sobrenadante de dicha transfección.

En el presente trabajo se han generado los siguientes rBVs:

- *FB-VP4* y *FB-HTVP4*: expresan a la proteasa viral VP4 en ausencia y presencia de un tag de seis His en su extremo amino terminal.
- *FB-HTVP4-K180A*: expresa VP4 con un tag de His en su extremo amino terminal y con la sustitución K180A.
- *FB-Poly-R505H*: expresa la poliproteína de IBDV con la sustitución R505H.

3.3 Infecciones y expresión de proteínas

3.3.1 Infección con rBVs

Cultivos confluentes de células H5 se infectaron a una multiplicidad de infección (moi) de 1-5 unidades formadoras de placa por célula (pfu/cel) del rBV correspondiente en un volumen mínimo de TC-100. Transcurrida 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y medio TC-100 suplementado con 2% de FCS fue añadido. Las células fueron recogidas a 48 horas post-infección (hpi) en el sistema FB a excepción del mutante FB-Poly-R505H que se recogió a las 72 hpi como con el sistema AcYM1.

En las coinfecciones con dos rBVs el proceso de infección se realizó durante 72 h y se evaluaron moi desde 0.5 hasta 5 pfu/cel, de los baculovirus AcYM1-Poly, FB-HTVP4 y FB-HTVP4-K180A.

3.3.2 Infección con rVV vT7/LacOI/Poly

Para la purificación de VLPs de IBDV a partir de rVV vT7/LacOI/Poly, cultivos preconfluentes de células QM7 se infectaron a una moi de 2-5 pfu/cel en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS y 2 mM IPTG (isopentenil tio- β -galactósido). Las células fueron recogidas a las 72 hpi.

Para la generación de stock de rVV vT7/LacOI/Poly, cultivos preconfluentes de células BSC-40 fueron infectados a una moi de 0.02 pfu/cel en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS. Las células fueron recogidas a las 72 hpi según el efecto citopático observado.

3.3.3 Infección con IBDV

Para la purificación de viriones de IBDV, cultivos de células QM7 a una confluencia del 70-80% se infectaron a una moi de 1-2 pfu/cel de IBDV en un volumen mínimo. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% FCS. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos a las 48-72 hpi según el efecto citopático observado.

Para la producción de stock de IBDV se siguió el mismo procedimiento empleando una moi de 0.02-0.05 pfu/cel y recogiendo los sobrenadantes de cultivo a las 72-96 hpi según el efecto citopático observado.

3.3.4 Titulación de stocks de rVV e IBDV

Los títulos de los stocks virales fueron determinados mediante ensayos de formación de placa. Se infectaron monocapas de células BSC-40 (rVV vT7/LacOI/Poly) o QM7 (IBDV) a una confluencia del 50-60% con diluciones seriadas de virus en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de absorción se retiró el inóculo y se añadió agar semisólido a una concentración final de 0.5% en medio DMEM suplementado con 2% de FCS. A las 72 hpi las monocapas fueron fijadas con formaldehído al 10% y teñidas con una solución acuosa de cristal violeta al 2%. El título se determinó mediante recuento de placas de lisis.

3.3.5 Transformación bacteriana y expresión de VP4

Para la expresión y purificación de HT-VP4 y VP4 en bacterias se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido pRSET-HTVP4 y pRSET-VP4 e inducidos con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Estos plásmidos, 5 ng, se emplearon para transformar bacterias competentes tras incubación durante 30 min en hielo seguida de un choque térmico

durante 90 s a 42 °C. A continuación fueron mantenidas a 4 °C durante 10 min y después se incubaron 2 h a 37 °C con agitación para favorecer la recuperación de las bacterias. Las células fueron extendidas en una placa de LB suplementada con 50 µg/ml de ampicilina y 35 µg/ml de cloranfenicol y se incubaron a 37 °C durante 16 h. La expresión de proteínas se realizó a partir del inóculo de una colonia en medio LB suplementado con ampicilina 50 µg/ml y cloranfenicol 35 µg/ml durante 16 h a 37 °C en agitación.

3.3.6 Secuenciación de baculovirus recombinantes

Monocapas de células H5 fueron infectadas con FB-Poly y AcYM1-Poly durante 48 h y 72 h respectivamente a una moi: 1-2 pfu/cel. Las células se recogieron y lavaron con PBS (tampón fosfato salino, pH 7.4), y se resuspendieron en el tampón: 50 mM Tris pH 8; 0.5 mM EDTA; 30% sacarosa, 1% de SDS y 2,5% de β-mercaptoetanol y se incubaron durante 30 min a 4 °C. A continuación se adicionó 100 µg/ml de proteinasa K y se incubó durante 1h a 37 °C seguido de 5 h a 50 °C. El DNA total fue extraído tratando la mezcla anterior con fenol:cloroformo y se resuspendió en H₂O. Este DNA se utilizó como molde para amplificar y secuenciar un total de 7 segmentos que cubren homogéneamente la secuencia entera de la poliproteína.

3.4 Purificación de proteínas y ensamblados virales

3.4.1 Purificación de proteínas y ensamblados derivados de la expresión con rBVs

Monocapas confluentes de células H5 fueron infectadas con los rBVs BV-Poly y AcYM1-Poly y se recogieron a 48 y 72 hpi respectivamente. Las células se lavaron con tampón PES (50 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂) y se lisaron en tampón PES suplementado con IGEPAL CA-630 (*Sigma*) al 1% e inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) durante 30 min. El lisado fue clarificado mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*). El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 rpm durante 150 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El sedimento resultante fue resuspendido en tampón PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 rpm durante 1 min, y el sobrenadante resultante fue cargado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 25-50% en PES y sometido a ultracentrifugación a 40,000rpm durante 45min en un rotor SW41. El gradiente se fraccionó en 12 alícuotas que se concentraron 20 veces mediante ultracentrifugación a 50,000 rpm durante 2h en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*). Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C (Saugar *et al.*, 2005).

3.4.2 Purificación de viriones de IBDV

El sobrenadante de cultivos de células QM7 infectadas con IBDV durante 72 h (moi: 1-2 pfu/cel) fue mezclado en una relación 1:5 (v:v) con PEG 20% 3 M NaCl e incubado con

agitación 16 h a 4 °C. Posteriormente, fue centrifugado a 3,000 rpm durante 30 min en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*), y el precipitado resultante fue resuspendido en PES, suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche*) y nuevamente centrifugado a 3,000 rpm durante 30min. El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 rpm durante 150 min en un rotor SW41. El sedimento resultante fue resuspendido en tampón PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 rpm durante 1 min, y el sobrenadante resultante fue cargado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 25-50% en PES y procesado como se describe en las etapas finales del apartado 3.4.1.

3.4.3 Purificación de VLPs derivadas de la expresión de rVV vT7/LacOI/Poly

Cultivos de células QM7 preconfluentes fueron infectados con rVV vT7/LacOI/Poly y recogidos a 72 hpi. Las células se lavaron con tampón PES y el sedimento celular resultante se lisó mediante la aplicación de 3 ciclos de congelación a -80°C seguida de descongelación a 37°C. Posteriormente las células se sometieron a 3 ciclos de sonicación de 10 s con intervalos de parada de 10 s. El lisado fue clarificado y purificado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.

3.4.4 Purificación de VP4

La proteína VP4 (con o sin *tag* de His) fue purificada a partir de cultivos de bacterias recombinantes inducidos durante 4 h a 37 °C con agitación. Inicialmente nos planteamos su purificación en columnas de afinidad pero al resultar insoluble se procedió a eliminar la mayor parte de los contaminantes del precipitado. Las bacterias inducidas fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en un tampón de lisis durante 30 min a 37 °C [20 mM Na₂HPO₄ pH 7.83, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 µg/µl DNasa, 4 µg/ml RNasa, 5 mM dithiothreitol (DTT), 2% Triton X-100], suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) y 10 mg/ml lisozima preparada en 10 mM TrisHCl pH 8. Posteriormente la solución fue centrifugada a 11,000 rpm en un rotor de ángulo fijo SS-34 (*Thermo Scientific*) durante 1 h a 4 °C. El sedimento resultante fue incubado en el tampón 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.83, 500 mM NaCl, 5 mM DTT y 2% Triton X-100 durante 30 min a 37 °C, y posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm durante 1 h (este procedimiento se repitió dos veces). Finalmente, el precipitado resultante se incubó durante 1 h a diferentes temperaturas, 4, 20 y 37 °C, y concentraciones de dodecil sulfato sódico (SDS) desde 0.01, 0.02, 0.1, 0.5 hasta 1% (v/v) en el tampón 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.83, 500 mM NaCl, 5 mM DTT; se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min y el sedimento resultante final fue resuspendido en PBS.

3.4.5 Purificación del bacteriófago T4

Un preinóculo de *E.coli* DH5 α fue utilizado para inocular 200 ml de LB hasta una densidad óptica (D.O) de 0.6-0.8 a 37 °C con agitación. Seguidamente el cultivo se infectó con el bacteriófago T4 (moi 1 pfu/cel) en agitación a 37 °C hasta D.O = 0.1. Posteriormente se clarificó el cultivo mediante centrifugación en el rotor 5624 (*Hettich Zentrifugen*) a 3,000 rpm, 15 min y los sobrenadantes resultantes fueron centrifugados nuevamente a 8,000 rpm (rotor G-S3, *Sorvall*) durante 16 h a 4 °C. El sedimento resultante fue resuspendido en 5 ml del tampón SCB (61.4 mM K₂HPO₄; 38.4 mM KH₂PO₄ y 1 mM MgSO₄) y se centrifugó 10 min a 3,000 rpm (rotor 5624, *Hettich Zentrifugen*) para eliminar restos insolubles. El sobrenadante resultante fue centrifugando a 25,000 rpm (SW28, Beckman) 195 min a 16 °C a través de un gradiente discontinuo de CsCl₂ (densidades: 1.45, 1.50 y 1.70 g/ml). La banda opalescente que contiene los fagos y se localiza en la interfase entre las densidades de 1.45 y 1.50 g/ml, fue extraída y dializada frente al tampón SCB durante 16 h a 4 °C.

3.5 Análisis bioquímico

3.5.1 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemmli (Laemmli, 1970) de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las muestras analizadas fueron mezcladas con tampón de desnaturalización 5x (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10mM DTT), hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y cargadas en geles de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) al 11% (para las construcciones de la poliproteína) y al 14% (para las construcciones con la proteasa viral). Posteriormente, dichos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa o teñidos con azul de Coomassie preparado al 2% (p/v) en una solución al 10% de metanol y 10% de ácido acético.

3.5.2 Electrotransferencia e inmunodetección (*Western blot*)

Una vez llevado a cabo el análisis por SDS-PAGE, las proteínas fueron electrotransferidas en condiciones semisecas durante 60 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran*, *Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 5 min el gel y las membranas en tampón Tris 48 mM, glicina 39mM, SDS 0.0375 % (p/v), metanol 20 % (v/v). Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en tampón PBS), durante 30 min a 20 °C y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario α -VP2 diluido 1:1,000, α -VP3 ó α -VP4 diluidos 1:2,000 en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 h a 20 °C con un anticuerpo secundario de cabra α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:10,000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 5 min y se reveló mediante la

utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*) o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0.025 % de H₂O₂.

3.5.3 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína total en las purificaciones de VP4 a partir de bacterias recombinantes fue determinada mediante el método comercial BCA (*Pierce*) (Smith, 1985) y utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA). También se estimó la cantidad de proteína purificada analizando simultáneamente las muestras con patrones de BSA, de concentración conocida, mediante SDS-PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie. Los geles fueron digitalizados en un escáner Perfection 3170 (*EPSON*) y se analizaron con el software de análisis cuantitativo Quantity One (*Bio Rad*).

3.5.4 Identificación de proteínas por espectrometría MALDI-TOF/TOF

Las proteínas de la fracción del gradiente de sacarosa enriquecida con estructuras similares a las cápsidas de IBVD, obtenidas a partir del baculovirus AcYM1-Poly, fueron fraccionadas mediante SDS-PAGE, teñidas con azul de Coomassie, y analizadas en el servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. Brevemente, las bandas fueron cortadas manualmente, depositadas en placas de 96 pocillos y digeridas con tripsina empleando un robot de digestión DP Proteineer (*Bruker Daltonics*) durante 6 h a 37 °C siguiendo un protocolo descrito previamente (Shevchenko *et al.*, 1996). Asimismo se digirieron bandas con quimotripsina a 25 °C durante 16 h. En ambos casos los péptidos resultantes fueron extraídos y secados por centrifugación en vacío y se resuspendieron en 4 µl de solución MALDI que contiene 30% acetonitrilo, 15% de isopropanol y 0.1% de ácido trifluoroacético. Una alícuota de 0.8 µl de los péptidos obtenidos fue depositada sobre una placa OptiTOFTM de 386 pocillos (*Applied Biosystems*) y se dejó secar a temperatura ambiente; a continuación se añadió a cada pocillo una alícuota de 0,8 µl de solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 3 mg/ml en solución MALDI) y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas de manera automática en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*, Desorción e ionización mediante láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) ABi 4800 (*Applied Biosystems*), cargándose los datos combinados de huella peptídica y espectrometría de masas tándem en el motor de búsqueda MASCOT v.2.1 (*Matrix Science*) para lo que se utilizó el programa GPS Explorer v4.9. Las búsquedas se realizaron frente a la base de datos de proteínas de UniProtKB.

3.6 Inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal

Células QM7 y H5 fueron crecidas sobre un cubreobjetos de cristal e infectadas con IBDV y rBV, a moi de 2 pfu/cel durante 24 o 48 h respectivamente. Las células fueron lavadas con PBS dos veces y fijadas con metanol al 20% durante 20 min a -20 °C. Seguidamente, el metanol fue evaporado y las células fijadas se incubaron durante 30 min con PBS al 5% FCS a 37 °C y después se incubaron con anticuerpos primarios específicos en PBS al 2% FCS a 37 °C. Transcurridos 45 min las células se lavaron con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron 45 min a 37 °C con anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón, conejo o rata acoplados con los fluoróforos Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde), preparados en PBS al 2% FCS. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI durante 30min a 20 °C. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un sistema confocal multiespectral Leica TCS SP5 (*Leica Microsystems*). Imágenes de 1024 × 1024 pixeles se adquirieron secuencialmente cada 0.3-0.5 µm utilizando un objetivo de 63x/1.40 N.A. de inmersión en aceite utilizando el software LAS AF v 2.6.0 (*Leica Microsystems*).

3.7 Microscopía electrónica

3.7.1 Contrastado de las muestras

3.7.1.1 Tinción negativa

Sobre una gota de 5 µl de muestra se depositó una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, *Emitech*). La rejilla fue incubada 3 min, lavada 2 veces en agua, y el exceso de líquido eliminado mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (*Whatman*). La concentración óptima de los diferentes ensamblados virales analizados fue determinada mediante diluciones seriadas. Las rejillas fueron incubadas sobre una gota de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 min y el exceso de agente de tinción se eliminó por contacto de la rejilla con papel de filtro. Para la visualización de la muestra se empleó un microscopio electrónico JEOL 12000 EXII estabilizado a 100kV y las imágenes fueron registradas en micrografías electrónicas (*Kodak SO-163*) a una magnificación nominal 40,000x que fueron reveladas (*Kodak, D-19*) durante 8 min a temperatura ambiente.

3.7.1.2 Sombreado metálico

El fago T4 fue usado como referencia interna para determinar la mano de los tubos helicoidales de VP4 ya que la cola del fago es una estructura helicoidal con giro hacia la derecha. Para ello ambas estructuras fueron mezcladas y adsorbidas sobre rejillas de carbón-colodión tal como se ha descrito en el apartado anterior. Seguidamente se congelaron en etano líquido enfriado con nitrógeno líquido y fueron introducidas en un equipo de criofractura BAF060 (*Bal-Tec AG*) y

mantenidas a -150 °C. A continuación, las muestras fueron sombreadas con 1 nm de platino (Pt) con un ángulo de incidencia de 45°, y con 10 nm de carbón (C) con un ángulo de 90°, ambos con la muestra en modo estacionario. El espesor de las capas de Pt y C se midió mediante un monitor de cristal de cuarzo. Las muestras fueron visualizadas en el microscopio electrónico JEOL 12000 EXII y las imágenes registradas en micrografías electrónicas Kodak SO-163, a una magnificación nominal 40,000x, fueron digitalizadas en un escáner Nikon Super CoolScan 9000 ED con un intervalo de muestreo de 14 µm/píxel, que se corresponde a 2.4 Å/píxel sobre el espécimen. El análisis se realizó en el servicio de microscopía del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO).

3.7.2 Análisis ultraestructural de la infección con IBDV

Monocapas de células QM7 a una confluencia del 70-80% fueron infectadas a una *moi* de 1-2 pfu/cel de IBDV en un volumen mínimo. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% FCS. A las 12, 24, 48 y 72 hpi, las células fueron fijadas químicamente en tampón Na₂HPO₄ 0.1 M pH 7.4, 2 % Glutaraldehído, 4 % Paraformaldehído durante 2 h a 4 °C y recogidas mediante rascado de la placa de cultivo y centrifugación. El sedimento fue lavado 3 veces con tampón 0.1 M Na₂HPO₄ pH 7.4, postfijado con 1% tetróxido de Osmio y 1% ferricianuro potásico durante 1 h a 4 °C, tratado con 0.15% ácido tánico en tampón 0.1 M Na₂HPO₄ pH 7.4 durante 1 min y teñido con 2% acetato de uranilo durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se deshidrataron las muestras mediante incubaciones de 10 min a 4 °C con concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 90, 95 y 100%), y posteriormente se infiltraron con concentraciones crecientes de resina epoxi (25, 50, 75, 100%). Finalmente, se polimerizaron en cápsulas de base piramidal a 60 °C durante 48 h. Los sedimentos de células incluidos se tallaron con cuchillas de vidrio, y se obtuvieron secciones ultrafinas (50-70 nm) con una cuchilla de diamante con una inclinación de 45° en un ultramicrotomo RMC MT6000_XL (RMC Inc.) que se depositaron en rejillas de cobre recubiertas de Formvar. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo saturado en condiciones de humedad y, posteriormente, con 2% de citrato de plomo.

3.7.3 Criomicroscopía electrónica

Para el análisis por criomicroscopía electrónica, 5 µl de la muestra fueron depositados sobre una cara de una rejilla de cobre-rodio cubierta con una película de carbón con agujeros (*Quantifoil* R2/2) previamente lavada con vapores de acetona. Las muestras fueron vitrificadas en etano líquido según los procedimientos previamente establecidos (Castón *et al.*, 2001; Dubochet *et al.*, 1988), quedando incluidas en una capa de hielo vítreo y conservando su estado nativo, en una unidad Leica EM CPC. Las muestras se visualizaron en un microscopio Tecnai G2 FEG 200 (FEI) equipado con un anticontaminador, y estabilizado a 200 kV, en el cual fueron cargadas

mediante un criobrazo GATAN 626.53P50. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal 50,000x bajo condiciones de mínima dosis electrónica en micrografías *Kodak* SO-163.

3.7.4 Procesamiento digital de especímenes con simetría icosaédrica

Las operaciones generales de procesamiento de imagen fueron llevadas a cabo mediante los paquetes de procesamiento Xmipp [<http://xmipp.cnb.csic.es/>, (Marabini *et al.*, 1996)] y Spider [http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/, (Frank *et al.*, 1996)]. Las criomicrografías electrónicas seleccionadas fueron digitalizadas en un escáner Photoscan TD (Zeiss) con un intervalo de muestreo de 7 $\mu\text{m}/\text{píxel}$, que se corresponde a 1.4 $\text{\AA}/\text{píxel}$ sobre el espécimen. Las imágenes de las partículas fueron seleccionadas manualmente mediante el programa X3d (Conway *et al.*, 1993), y estas coordenadas fueron utilizadas para extraer y normalizar las partículas con el paquete Xmipp. Se seleccionaron un total de 369 imágenes de VLPs de AcYM1-Poly, 424 de VLP de rVV vT7/LacOI/Poly y 400 de viriones de IBDV.

El rango de desenfoque fue calculado analizando las transformadas de Fourier promedio de cada micrografía. La corrección de la CTF se realizó con Bshow, perteneciente al paquete Bsoft [<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/lsbr/software/bsoft/>, (Heymann y Belnap, 2007)]. Para las micrografías analizadas, se determinó que el rango de desenfoque estaba comprendido entre 0.7 y 3.1 μm en el caso de las imágenes de VLPs de AcYM1-Poly, 1.5 y 4.0 μm para las de rVV vT7/LacOI/Poly, y 0.5 y 3.8 μm para los viriones de IBDV.

La orientación y centrado inicial de las partículas en ambos procesamientos fue determinada utilizando como modelo inicial un mapa tridimensional de la cápsida de IBDV obtenido previamente en nuestro laboratorio (Luque *et al.*, 2007) escalado y filtrado a 35 \AA de resolución. Se calculó un nuevo mapa de densidad que se usó para las subsiguientes etapas de refinamiento iterativo de los ángulos de orientación y centros de las partículas.

Las 3DRs fueron calculadas usando métodos de Fourier-Bessel (Crowther *et al.*, 1970; Fuller *et al.*, 1996) e imponiendo simetría icosaédrica en los mapas de densidad finales. Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel, 1984) entre dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en cada reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0.5 (criterio FSC = 0.5). Las resoluciones calculadas para la cápsidas de AcYM1-Poly, rVV vT7/LacOI/Poly y los viriones de IBDV fueron de 25.0, 21.2 y 25 \AA , respectivamente.

Los perfiles de densidad radial promedio de las cápsidas de AcYM1-Poly, rVV vT7/LacOI/Poly y viriones de IBDV se calcularon con el paquete Spider (Frank *et al.*, 1996), y fueron normalizados y escalados adecuadamente. El mapa de diferencia entre las reconstrucciones se calculó utilizando Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, (Pettersen *et al.*, 2004)],

sustrayendo el mapa de rVV vT7/LacOI/Poly (o de los viriones de IBDV) al de AcYM1-Poly para revelar las densidades adicionales en esta última.

3.7.5 Procesamiento digital de especímenes con simetría helicoidal

Además de los paquetes de procesamiento de Bsoft, Xmipp y Spider se utilizaron EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) y EMAN2 (Tang *et al.*, 2007). El algoritmo IHRSR (*iterative helical real space reconstruction*) fue usado para generar las reconstrucciones (Egelman, 2000). Las criomicrografías electrónicas seleccionadas fueron digitalizadas en un escáner Nikon Super CoolScan 9000 ED con un intervalo de muestreo de 6.35 $\mu\text{m}/\text{píxel}$, que se corresponde a 1.27 $\text{\AA}/\text{píxel}$ sobre el espécimen. Las micrografías fueron submuestreadas 2x respecto a la frecuencia de muestreo original.

El rango de desenfoque y corrección de la CTF fueron calculados con Bsoft (Heymann y Belnap, 2007). El programa Helixboxer de EMAN2 se utilizó para seleccionar manualmente y extraer 609 estructuras tubulares de VP4 que dieron lugar a 23,068 partículas formadas por segmentos solapantes en los filamentos de 180 píxeles de largo, con una variación entre dos segmentos consecutivos de 10 píxeles (respecto a imágenes escaneadas a 2.54 $\text{\AA}/\text{píxel}$). El patrón de difracción de alguno de los filamentos más largos mostraba claramente dos líneas de puntos de difracción (*layer lines*) a frecuencias de $\sim 1/55 \text{ \AA}^{-1}$ y $\sim 1/27 \text{ \AA}^{-1}$. Considerando el diámetro de 246 \AA de los tubos de VP4, y la distancia entre el meridiano de su transformada de Fourier y los puntos de difracción más próximos para cada *layer line*, dichos puntos tienen un orden 3 de función de Bessel que se corresponde con una hélice de tres hebras. La comparación de este patrón con el que se obtuvo a partir de imágenes de tubos de VP4 analizados por criosecado y sombreado metálico permitió determinar que el primer punto de difracción de la *layer line* a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$ se corresponde con el orden de Bessel $n = +3$, es decir es una hélice dextrógira. Como control interno se utilizó el bacteriófago T4 visualizado conjuntamente con los tubos de VP4. El patrón de difracción promedio de los segmentos de tubos de VP4 permitió detectar, además de las *layer lines* a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$ y $\sim 1/27 \text{ \AA}^{-1}$, la línea meridional $n = 0$ (correspondiente a una frecuencia $\sim 1/18 \text{ \AA}^{-1}$). El listado anotado de los puntos de la red helicoidal, considerando que la *layer line* a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$ es dextrógira ($n = +3$), indica que la *layer line* a $\sim 1/27 \text{ \AA}^{-1}$ es levógira (con un orden de Bessel $n = -3$). Estos análisis implican una elevación axial de $\sim 18 \text{ \AA}$ y un ángulo de rotación de $\sim 40^\circ$, datos que se usaron como parámetros iniciales en el proceso iterativo de IHRSR. Este procedimiento combina la búsqueda de orientaciones y orígenes mediante la asignación de proyecciones de un volumen y las imágenes experimentales, la reconstrucción tridimensional mediante métodos de Fourier-Bessel, refinamiento de los parámetros de simetría helicoidal de dicho volumen, y la imposición de los parámetros de simetría obtenidos para calcular un mapa de mayor resolución (Figura 10). Mediante esta

aproximación los valores de elevación axial (o traslación en el eje h) y ángulo de rotación o giro convergen a una solución de 18.4 Å y 40.6°, respectivamente.

La resolución del mapa se calculó a partir de la función FSC entre dos mapas independientes del tubo helicoidal de VP4, que contienen cada uno la mitad de los segmentos incluidos en cada reconstrucción final (van Heel, 1984). Según el criterio $FSC = 0.5$ y $FSC = 0.3$, la resolución obtenida fue de 8.8 y 7.6 Å, respectivamente. El perfil de decaimiento de la intensidad de las frecuencias fue calculado y corregido con Embfactor (Fernandez *et al.*, 2008)

La subunidad asimétrica del tubo de VP4 fue segmentada mediante el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). De forma general, los límites de la misma fueron establecidos a partir de la evaluación de las conectividades entre densidades contiguas del mapa a diferentes niveles de umbralización. Para confirmar que la densidad seleccionada corresponde a una sola subunidad asimétrica, y evitar por tanto solapamientos o pérdidas de densidades, el mapa del tubo completo fue restaurado a partir de la densidad segmentada mediante la aplicación de los parámetros de la simetría helicoidal.

La determinación y localización de los elementos de estructura secundaria (SSE) en el mapa de crio-ME fue realizada con la herramienta SSEHunter (Baker *et al.*, 2007), que se encuentra integrada dentro del paquete Gorgon (Baker *et al.*, 2011). Este procedimiento analiza el mapa de densidades mediante tres criterios independientes: (1) la generación de una estructura de pseudoátomos, en la que se evalúa la posición y distancia de cada uno de ellos respecto a los situados en su entorno; (2) la construcción de un esqueleto que representa la forma y topología específica del mapa; y (3) la búsqueda de hélices α mediante la correlación de una hélice α prototipo con las distintas zonas del mapa de densidad. El conjunto de estas valoraciones queda reflejado en un modelo de pseudo-átomos que es utilizado para la anotación manual de los SSE y la generación de un modelo de hélices α y láminas β del mapa.

3.7.6 Alineamiento múltiple de secuencias de VP4 y predicción de SSE

Los alineamientos múltiples de las secuencias de las proteínas VP4 de IBDV (nº acceso Uniprot, Q9WI42), TV1 (Q2PBR5), IPNV (Q703G9), BSNV (Q8AZM0), YAV (P89521) y DXV (Q96724) fueron realizados con PROMALS3D [<http://prodata.swmed.edu/promals3d>, (Pei *et al.*, 2008)], usando la información estructural disponible de la base de datos del *Protein Data Bank* como guía del alineamiento [nº de acceso PDB: 4izj (YAV), 2pnm (IPNV), 3p06 (TV1), 2gef (BSNV)].

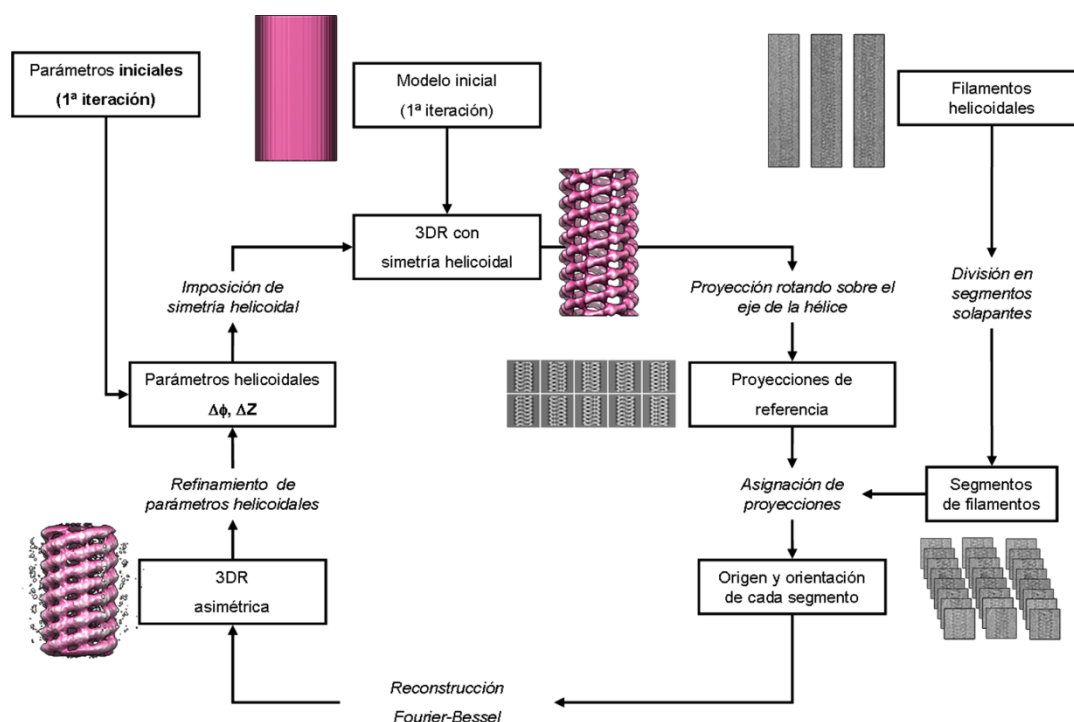


Figura 10. El algoritmo IHRSR. Un volumen de referencia (modelo inicial) o un modelo con simetría helicoidal generado en la iteración anterior es proyectado para obtener una serie de proyecciones de referencia cuya diferencia radica en sus ángulos de rotación sobre el eje azimutal. A partir de imágenes de los filamentos helicoidales se generan segmentos parcialmente solapantes. Dichos segmentos son asignados a una de las proyecciones de referencia. El origen y orientación determinados en este proceso son usados para generar una 3DR asimétrica. Los parámetros de simetría helicoidal son refinados a partir de este mapa e impuestos al mismo para generar una 3DR con simetría helicoidal que será el mapa inicial en el siguiente ciclo.

Las predicciones de elementos de estructura secundaria (SSE) para la VP4 de IBDV fueron generadas a partir de los programas PsiPred [<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, (McGuffin *et al.*, 2000)], Jpred [<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>, (Cole *et al.*, 2008)], Sable [<http://sable.cchmc.org>, (Adamczak *et al.*, 2005)] Sspro4 [<http://download.igb.uci.edu/sspro4.html>, (Cheng *et al.*, 2005)], Yaspin [<http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>, (Lin *et al.*, 2005)] y Profsec [<http://www.predictprotein.org/>, (Rost *et al.*, 2004)]. Para cada posición de la secuencia se obtuvo una predicción consenso por mayoría simple.

3.7.7 Modelado por homología y ajuste flexible

La estructura de la proteína VP4 de IBDV fue generada usando como moldes las estructuras atómicas de las cuatro proteínas homólogas determinadas hasta el momento: BSNV (2gef), YAV (4izj), IPNV (2pnm) y TV1 (3p06). El modelo por homología fue obtenido con el programa Modeller 9v3 [<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/modeller>, (Sali *et al.*, 1995)].

El ajuste del modelo atómico de la VP4 de IBDV en la subunidad asimétrica del mapa de densidades se realizó con el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) o la rutina Colacor del

programa Situs (Wriggers y Birmanns, 2001) obteniendo resultados similares. Para optimizar el ajuste inicial con el mapa de crio-ME se consideró el núcleo común de las distintas estructuras de VP4 y se eliminaron las zonas de mayor variabilidad correspondientes a los extremos amino y carboxilo. El dímero generado de VP4 fue ajustado de modo flexible ya que las hélices α están desplazadas respecto a sus correspondientes densidades en el mapa de crio-ME. Las disposiciones de las hélices α fueron refinadas para optimizar su correlación local, pero preservando las posiciones de los residuos catalíticos y de aquellos implicados en la colocación del sustrato. Además, para dar cuenta de la cavidad interna del mapa de crio-ME (en forma de Y) se reposicionaron la horquilla β del segmento 52-63 y el lazo 134-139. Finalmente, la densidad que da cuenta de la lámina β localizada en la interfaz entre los dos monómeros de VP4 (responsable de la estabilidad del dímero de VP4) fue modelada a partir de la región amino terminal de la VP4 de BSNV, que contiene una cadena β en la estructura del cristal con la que tiene una mayor homología de secuencia. El ajuste flexible de los SSE, así como el modelado de las conexiones entre los mismos, se realizaron con Coot (Emsley *et al.*, 2010) y la idealización de geometría del modelo se realizó con el programa Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1999).

Con el modelo pseudo-atómico de VP4 se generó la correspondiente estructura helicoidal y se calculó un mapa diferencia con respecto al mapa de crio-ME. El mapa diferencia resultante (11% del mapa de crio-ME original) da cuenta de los 8 residuos amino terminal y 30 de la región carboxilo terminal que no están representados en nuestro modelo.

La calidad del modelo final de VP4 fue confirmada tanto por inspección visual como por la evolución favorable de los coeficientes de correlación entre el mapa de densidad y las coordenadas atómicas de los modelos generados: desde CC= 0.784 para el modelo inicial que carece de la región amino terminal y sin realizar el ajuste flexible, hasta CC=0.864 para el modelo final ajustado de forma flexible e incluyendo la región amino terminal.

4. Resultados

4.1 Ensamblados macromoleculares de IBDV a partir distintos sistemas de baculovirus

4.1.1 Análisis de estructuras virales en células infectadas con IBDV

Durante la infección con IBDV se forman dos clases mayoritarias de ensamblados macromoleculares: cápsidas T=13I con un diámetro de ~70nm y tubos de tipo II de ~25 nm formados por VP4 (Coulibaly *et al.*, 2005; Granzow *et al.*, 1997; Saugar *et al.*, 2005). Además, también se detectan en menor medida estructuras tubulares de tipo I, de ~55 nm, constituidas por pVP2 (Saugar *et al.*, 2005). Mientras que las cápsidas están constituidas por trímeros de VP2 organizados en hexámeros y pentámeros, los tubos tipo I están constituidos por trímeros de pVP2 formando exclusivamente hexámeros. La expresión de la poliproteína de IBDV a partir de distintos sistemas nos ha permitido disponer de VLPs similares a la cápsida del virión y de diversas estructuras tubulares de pVP2 e intermediarios con distintas delecciones en el extremo carboxilo terminal (Fernandez-Arias *et al.*, 1998; Lombardo *et al.*, 1999; Martinez-Torrecuadrada *et al.*, 2000). En nuestro laboratorio estamos llevando a cabo la caracterización estructural de los ensamblados macromoleculares que se generan durante la infección con IBDV como primer paso para definir la función de estos ensamblados.

Con objeto de establecer los controles internos para comparar las estructuras formadas durante la infección con IBDV con los ensamblados macromoleculares resultantes en la expresión de la poliproteína a partir de sistemas basados en rBV, células QM7 fueron infectadas con IBDV (moi 1-2 pfu/cel), recogidas a distintos tiempos post-infección, y preparadas para su análisis por microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.2. Las imágenes de secciones de células infectadas con IBDV a las 12 hpi muestran que el citoplasma celular contiene cápsidas y tubos de ~55 y 25 nm de diámetro, respectivamente (Figura 11A). El diámetro y aspecto de estos tubos se corresponde a los tubos de tipo II descritos en el párrafo anterior. A medida que la infección progresa, a 24 y 48 hpi, las cápsidas se agrupan formando agregados paracristalinos que, aparentemente, están incluidos en una vesícula citoplasmática, (Figuras 11B y 11C). A las 72 hpi, las células están muy dañadas, apenas se reconocen estructuras celulares y solo se encuentran tubos de ~25 nm en el citoplasma celular (Figura 11D). Estos resultados indican que las estructuras tubulares de VP4, observadas a tiempos postinfección relativamente cortos, son un ensamblado natural y programado en el ciclo viral de IBDV

También se realizó un seguimiento mediante inmunofluorescencia (IF) de la infección de IBDV, siguiendo procedimientos previamente establecidos (Lombardo *et al.*, 1999; Maraver *et al.*, 2003; Oña *et al.* 2004), pero incluyendo también por primera vez la detección con anticuerpos frente a VP4 producidos en este trabajo, además de los anticuerpos frente a VP2 y VP3. Para

ello se infectaron células QM7 a una moi 1-2 pfu/cel. A 24 hpi las células fueron fijadas y permeabilizadas para su análisis mediante microscopía de fluorescencia y posteriormente se incubaron con anticuerpos específicos α -VP2, α -VP3 y α -VP4. La Figura 12 muestra el patrón de distribución subcelular de cada una de las proteínas de IBDV en células QM7 infectadas.

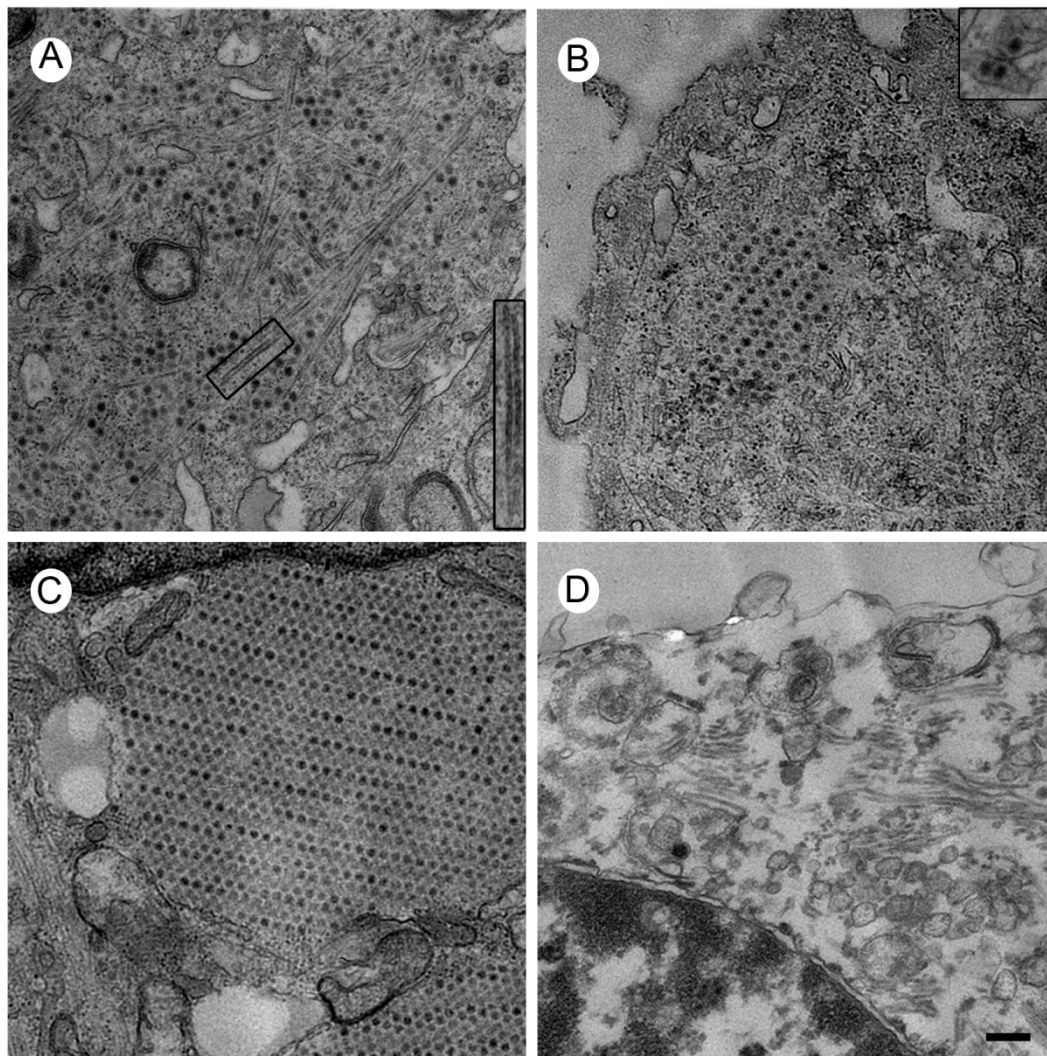


Figura 11. Secciones ultrafinas de células QM7 infectadas con IBDV. Monocapas de QM7 fueron infectadas con IBDV y recogidas a 12, 24, 48 y 72 hpi. y posteriormente incluidas en resinas epoxi para su visualización al microscopio electrónico por tinción negativa. (A) Secciones ultrafinas de QM7 infectadas con IBDV a las 12 hpi: cápsidas T=13 y tubos tipo II (recuadro) son las estructuras dominantes. (B y C) Formación de paracristales de cápsidas T=13 a las (B) 24 hpi y (C) 48 hpi, respectivamente. Los paracristales están bordeados por una membrana (11B inserto). (D) Efecto citopático causado por la infección tras 72 hpi donde sólo se observan tubos tipo II en el citoplasma celular; la cromatina del núcleo se encuentra condensada y dispuesta alrededor de la membrana nuclear. La barra de escala corresponde a 200 nm.

Las proteínas VP2 y VP3 presentan un patrón de distribución difuso y también forman estructuras de aspecto circular y de distintos tamaños. Ambas proteínas colocalizan en algunas zonas (Figura 12A-C) mientras que VP4 posee un patrón tubular que rodea al núcleo y no colocaliza con VP2 (Figura 12D-F). El patrón de VP2 y VP3 se denomina de viroplásmico: las

zonas de colocalización se corresponde con puntos de síntesis activa de las proteínas estructurales; el patrón punteado se puede corresponder con los agregados paracristalinos observados anteriormente en los cortes ultrafinos (Figuras 11B y C), donde el acceso de los anticuerpos α -VP3 está limitado.

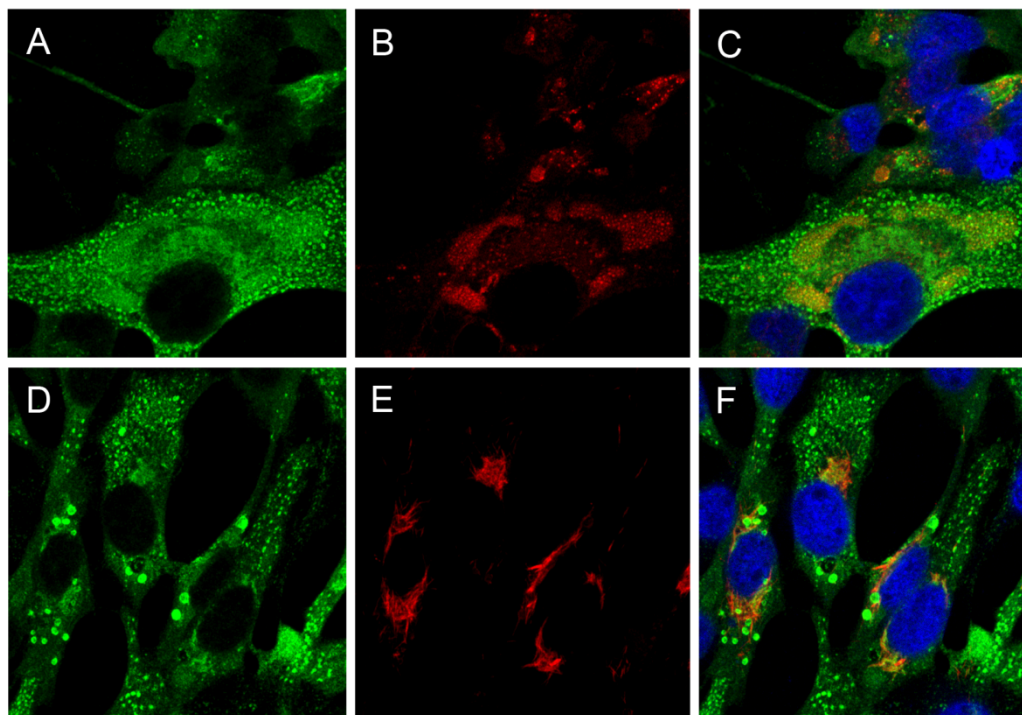


Figura 12. Análisis de la distribución subcelular de proteínas virales por IF en células QM7 infectadas con IBDV. Las células se fijaron a las 24 hpi, fueron incubadas con anticuerpos específicos (A y D) α -VP2 de conejo y ratón, respectivamente, (B) α -VP3 de rata y (E) α -VP4 de conejo seguido de una incubación con anticuerpos secundarios frente a IgG de rata, conejo, o ratón conjugados con los fluorocromos Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). (C y F) Análisis de colocalización mediante la superposición de las imágenes A y B, y de las imágenes D y E, respectivamente. En azul se observa la señal correspondiente al DAPI.

4.1.2 Análisis por IF de células infectadas por rBV FB-Poly y AcYM1-Poly

Los numerosos estudios realizados sobre las bases estructurales y moleculares del polimorfismo estructural de (p)VP2 (Irigoyen *et al.*, 2012; Irigoyen *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2009a; Luque *et al.*, 2009b; Luque *et al.*, 2007; Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005) nos han permitido establecer los elementos mínimos necesarios para el ensamblaje eficiente de VLPs idénticas al virión de IBDV a partir de sistemas simples de expresión recombinante. Dependiendo del sistema de expresión utilizado, se han podido obtener las mismas estructuras que en infecciones nativas (Chevalier *et al.*, 2004; Fernandez-Arias *et al.*, 1998). En nuestro laboratorio hemos expresado la poliproteína de IBDV mediante dos rBV que, en principio, son deficientes en el ensamblaje de VLPs similares a la cápsida del virión (Martinez-Torrecuadrada *et al.*, 2000). Mientras que con la expresión del rBV FB-Poly se generan tubos rígidos constituidos por pVP2 similares a los tubos tipo I, con la expresión del rBV AcYM1-Poly se obtienen estructuras

tubulares cerradas en sus extremos por estructuras similares a cápsidas; además también se forman unas VLPs de aspecto esférico en comparación con los viriones icosaédricos.

En este trabajo se ha planteado un análisis exhaustivo de los ensamblados macromoleculares relacionados con IBDV y la determinación de los factores que determinan las diferencias encontradas con ambos sistemas de rBV. Para ello, en primer lugar los patrones de expresión de los dos rBV fueron evaluados por microscopia confocal. Monocapas de células H5 fueron infectadas con FB-Poly o AcYM1-Poly (*moi* 1-2 pfu/cel) y después de 48 h se fijaron e incubaron con anticuerpos específicos contra VP2, VP3 y VP4. La expresión de FB-Poly genera un patrón tubular definido para VP2, VP3 y VP4 (Figura 13A, B, D y E). Mientras VP3 colocaliza con pVP2, sugiriendo que ambas proteínas forman parte de los mismos haces de estructuras filamentosas (Figura 13C), los filamentos de VP4 están muy próximos con los de VP2, aunque no colocalizan completamente (Figura 13F). Por otra parte, la expresión de AcYM1-Poly da lugar a un patrón completamente distinto; VP2 y VP3 se distribuyen de manera homogénea en el citoplasma con una colocalización casi total (Figura 13G-I), y la misma distribución es observada para VP4 que colocaliza con VP2 (Figura 13J-L), pero ya no se observa el patrón tubular de las células infectadas con FB-Poly. En comparación con los patrones de distribución en infecciones con IBDV a 24 hpi (Figura 12), la VP4 del rBV FB-Poly y las proteínas VP2 y VP3 del rBV AcYM1-Poly VP4 se comportan de forma similar. Estas diferencias indican que es necesario un análisis bioquímico, estructural y genético de los productos de expresión del gen de la poliproteína de IBDV utilizado en ambos vectores.

4.1.3 Análisis bioquímico y por microscopía electrónica de las estructuras derivadas de la expresión de FB-Poly

Una vez comprobada la expresión del rBV FB-Poly, se llevaron a cabo infecciones a escala semipreparativa en células H5 infectadas durante 48 h con FB-Poly (*moi* 1-2 pfu/cel), y los ensamblados resultantes fueron purificados mediante ultracentrifugaciones sucesivas en un colchón (25%) y en un gradiente lineal (25-50%) de sacarosa. Las fracciones de dichos gradientes fueron concentradas, analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 14A), y posteriormente observadas al microscopio electrónico por tinción negativa (Figura 14C). Como control interno del experimento se purificaron y analizaron los viriones formados en células QM7 infectadas con IBDV. En infecciones con FB-Poly principalmente se purifican ensamblados constituidos por pVP2

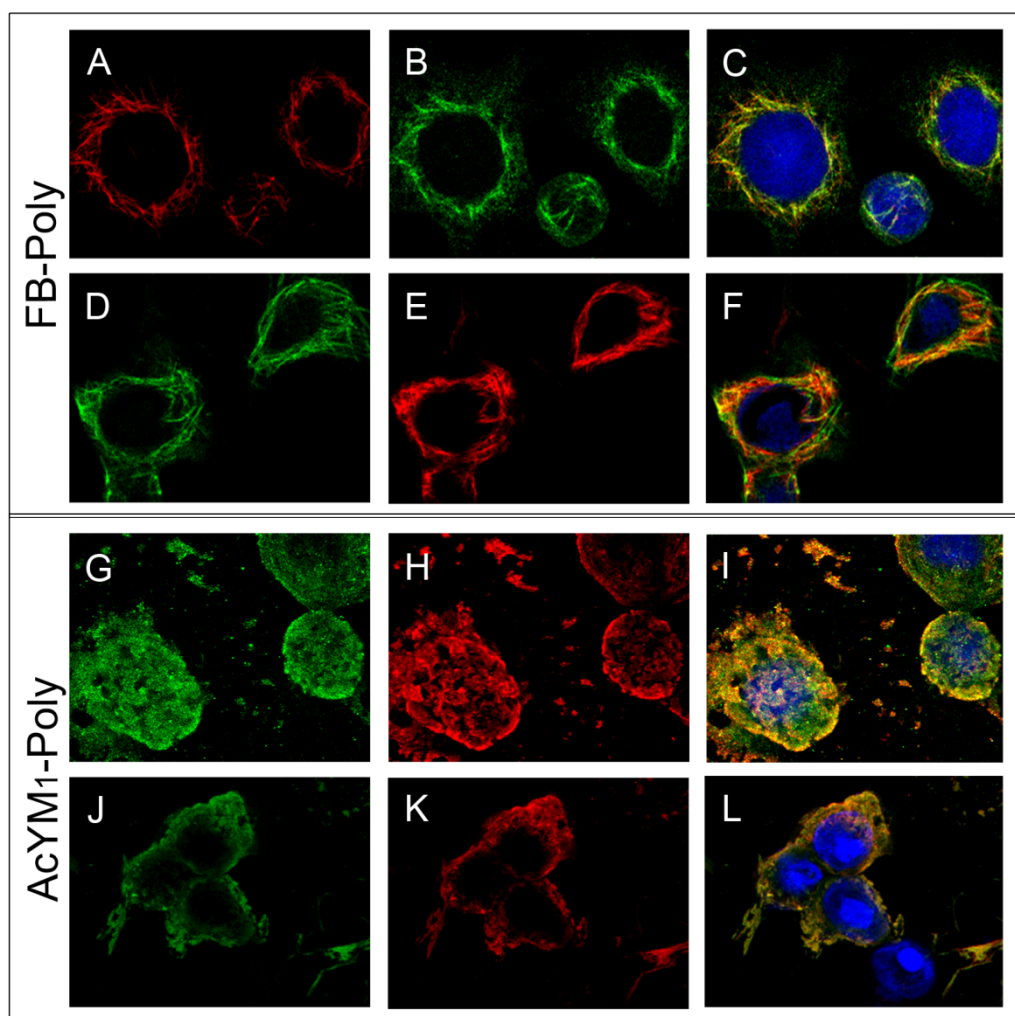


Figura 13. Análisis por IF de la expresión de la poliproteína de IBDV mediante los rBV FB-Poly y AcYM1-Poly. (A-F) Análisis por IF de células H5 infectadas con FB-Poly a 48 hpi incubadas con anticuerpos específicos (A, D) α -VP2, (B) α -VP3 y (E) α -VP4. (C y F) Análisis de colocalización mediante la superposición de las imágenes A y B, y de las imágenes D y E, respectivamente. (G-L) Análisis por IF de células H5 infectadas con AcYM1-Poly a 48 hpi incubadas con anticuerpos específicos (G, J) α -VP2, (H) α -VP3 y (K) α -VP4. (I y L) Análisis de colocalización mediante la superposición de las imágenes G y H, y de las imágenes J y K, respectivamente. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). Los núcleos se muestran en azul mediante tinción con DAPI.

con una movilidad electroforética de ~48kDa, que migran hacia la mitad inferior del gradiente de sacarosa (Figura 14A), como se había descrito previamente por nuestro grupo (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000). Estas fracciones constituidas por pVP2 están formadas por estructuras tubulares rígidas de ~55 nm de diámetro (Figura 14C), formados por hexámeros de trímeros de pVP2 (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000). Puesto que los análisis por IF mostraban una colocalización de (p)VP2 y VP3 en haces filamentosos en las células H5 antes de iniciar el proceso de purificación, se analizaron las fracciones generadas durante la purificación de los tubos de pVP2 por SDS-PAGE y WB con un suero α -VP3 para determinar cuando VP3 deja de formar parte de estos ensamblados tubulares (Figura 14B). Estos análisis mostraron que

la mayor parte de las interacciones no covalentes entre VP3 y pVP2 se rompen durante la ultracentrifugación a través del colchón de sacarosa (Figura 14B, carril 4).

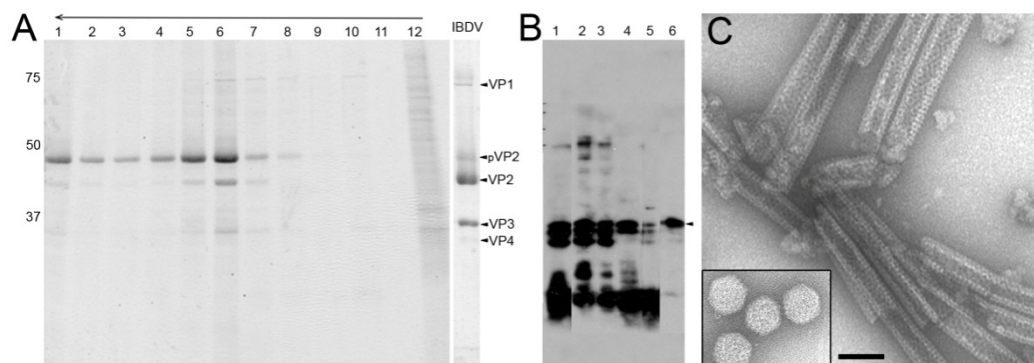


Figura 14. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la expresión de FB-Poly. (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas en la purificación en el gradiente de sacarosa, de los ensamblados derivados de la expresión de FB-Poly. La flecha superior en el gradiente indica la dirección de sedimentación. Como control se muestra el análisis de virones de IBDV purificados, indicando las proteínas estructurales VP1, pVP2, VP2, VP3 y VP4. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y WB α -VP3 de las fracciones obtenidas durante la purificación de los tubos de pVP2 a partir de FB-Poly: (1) Extracto celular total; (2, 3) Sobrenadante y precipitado, respectivamente, resultantes del clarificado inicial; (4) Fracción soluble que no atraviesa el colchón de sacarosa (sobrenadante y colchón); (5) Fracción que precipita a través del colchón de sacarosa; (6) Control de IBDV. La flecha indica la banda correspondiente a VP3. (C) Análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de la fracción 4 del gradiente mostrado en (A) donde se observan los tubos tipo I. En el recuadro se muestran virones purificados de IBDV resultantes de la infección de células QM7 durante 72 h. La barra de escala corresponde a 100 nm.

4.1.4 Análisis bioquímico y por microscopía electrónica de las estructuras derivadas de la expresión de AcYM1-Poly

Células H5 infectadas con AcYM1-Poly (*moi* 1-2 pfu/cel) y recogidas a 72 hpi, fueron sometidas al mismo protocolo de purificación a escala semipreparativa mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa; las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y por microscopía electrónica mediante tinción negativa. El perfil bioquímico es muy distinto con respecto al observado con FB-Poly; los ensamblados macromoleculares se distribuyen en las zonas inferior y central del gradiente y están constituidos por tres bandas mayoritarias con pesos moleculares de ~77, ~48 y ~35 kDa (Figura 15A). Las fracciones del gradiente analizadas por microscopía electrónica y tinción negativa mostraron una variedad de ensamblados virales (Figuras 15 B-F). En las zonas inferiores del gradiente correspondientes a las fracciones 2 (Figura 15B) y 4 (Figura 15C) se observan estructuras tubulares de un diámetro de ~50 nm (y hasta 1 μ m de largo), similares a los tubos tipo I, pero los extremos del tubo están cerrados por una caperuza (*cap*) con forma de cápsida. En las fracciones 6 (Figura 15D) y 8 (Figura 15E) de la zona central del gradiente, el material observado forma una colección heterogénea de VLPs (con diámetros de 55-75 nm) que, en algunos casos, tiene una morfología icosaédrica, aunque es mas esférica que las de los

viriones de IBDV. En la fracción 10 del gradiente (Figura 15F) se observan vesículas y agregados irregulares de menor tamaño que las VLPs. Estos resultados sugieren que las estructuras ensambladas a partir de la expresión de AcYM1-Poly están constituidas por los mismos componentes. Además, usando este sistema de baculovirus hemos reproducido en parte los ensamblados macromoleculares que se forman durante una infección natural de IBDV.

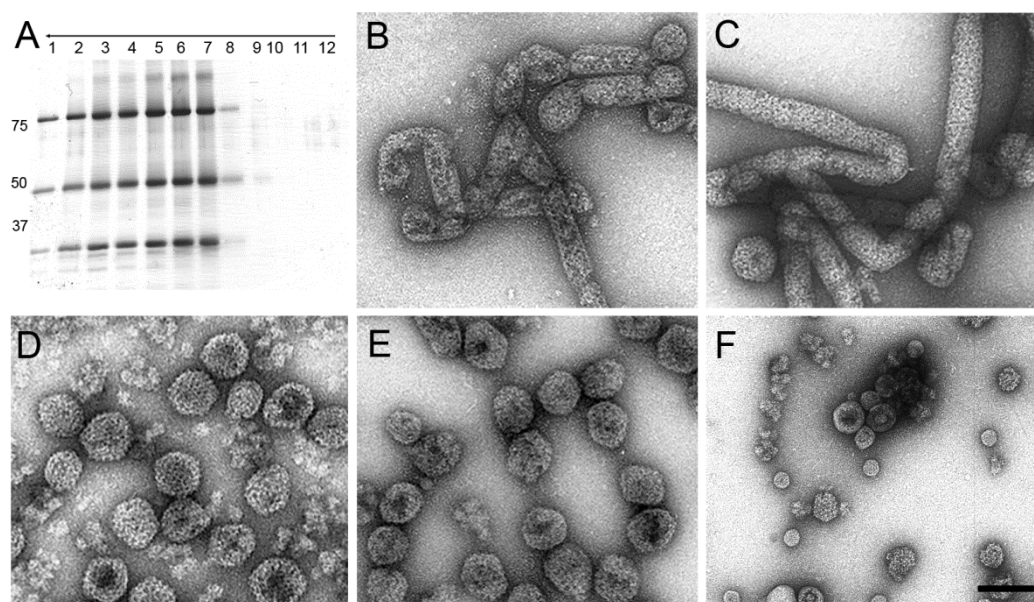


Figura 15. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la expresión de AcYM1-Poly. (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas en la purificación en el gradiente de sacarosa de los ensamblados derivados de la expresión de AcYM1-Poly. La flecha superior en el gradiente indica la dirección de sedimentación. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. (B-F) Análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de las fracciones (B) 2, (C) 4, (D) 6, (E) 8 y (F) 10 del gradiente. La barra de escala corresponde a 100 nm

Los tubos tipo I de FB-Poly y los tubos flexibles con caperuza icosaédrica en los extremos de AcYM1-Poly han sido analizados en detalle por métodos de Fourier (Castón *et al.*, 2008). Ambos ensamblados tubulares están formados por unidades estructurales similares con un perfil trimérico, ordenadas exclusivamente como hexámeros. Los trímeros de pVP2 de los tubos tipo I tienen una morfología y tamaño (~4 nm de diámetro) similar a la de los trímeros de VP2 en la cápsida de IBDV. Por tanto, las estructuras triméricas de los tubos de AcYM1-Poly deben de estar formadas por alguna forma de pVP2 aunque su composición proteica es más compleja. Estos resultados demandan una caracterización bioquímica de las proteínas resultantes de la expresión de AcYM1-Poly.

4.1.5 Identificación de las proteínas estructurales derivadas de AcYM1-Poly

Las tres bandas de proteína que forman las estructuras macromoleculares derivadas de AcYM1-Poly, cuyos pesos moleculares son ~77, ~48 y ~35 kDa no pueden ser identificadas directamente en base a su movilidad electroforética. Con este objetivo se seleccionó una

fracción del gradiente de sacarosa, la fracción 6 por estar especialmente enriquecida en VLPs, y se analizó mediante SDS-PAGE y WB con sueros específicos α -VP2, α -VP3 y α -VP4. El análisis por WB muestra que la proteína de ~77 kDa es reconocida con los tres sueros, la de ~48 kDa sólo con el suero α -VP2 y la de ~35 kDa con los sueros α -VP3 y α -VP4 (Figura 16A-D). Este resultado sugiere que los constituyentes estructurales analizados son formas precursoras de las proteínas estructurales que se encuentran en los viriones maduros, e implica que el procesamiento de la poliproteína en este sistema no es tan eficiente como con el FB-Poly. Además, mientras que el procesamiento proteolítico entre pVP2 y VP4 está parcialmente bloqueado, el procesamiento entre VP4 y VP3 está prácticamente bloqueado. Sin embargo, la movilidad electroforética anómala que presentan las proteínas de la fracción 6 no excluye otras explicaciones más improbables (por ejemplo, deleciones internas que den cuenta de un menor tamaño). Este desfase de movilidades es importante: la movilidad teórica de la poliproteína se corresponde con un peso molecular de ~107 kDa (en lugar de ~77 kDa) ya que contiene pVP2 (54kDa), VP4 (25kDa) y VP3 (28kDa), y la banda de ~35 kDa debería corresponder a ~53kDa si contiene VP4 y VP3.

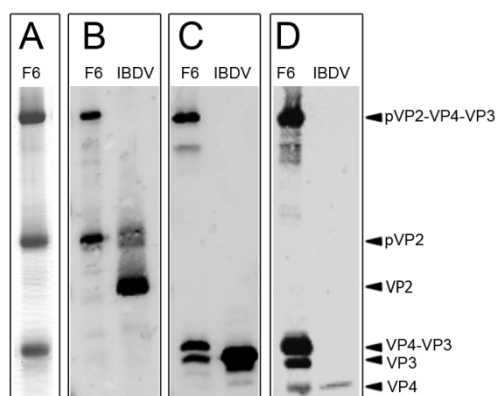


Figura 16. Análisis de las proteínas estructurales derivadas de AcYM1-Poly mediante SDS-PAGE y WB. (A) Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la fracción 6 (F6) del gradiente de sacarosa de AcYM1-Poly. (B-D) F6 y un control de IBDV analizados por SDS-PAGE y WB con el suero específico (C) α -VP2. (D) α -VP3 y (E) α -VP4. Las flechas indican la composición de cada banda según el reconocimiento con cada suero específico.

Con el fin de identificar con mayor precisión las bandas de ~77, ~48 y ~35 kDa, éstas fueron recortadas manualmente de los geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y analizadas mediante espectroscopía MALDI-TOF/TOF. Las bandas fueron previamente digeridas con tripsina y quimotripsina por separado y se determinaron los péptidos generados a partir de las masas moleculares detectadas (Figura 17). Para la banda de ~77 kDa se detectaron péptidos que abarcan el 77,4% de la secuencia completa, e incluyen el extremo amino terminal de pVP2, el extremo carboxilo terminal de VP3, y las regiones entre pVP2-VP4 y VP4-VP3, indicando que esta banda se corresponde con la poliproteína completa. Para la banda de ~48 kDa se abarcó el 80.1% y se identificaron péptidos desde el extremo amino terminal hasta el carboxilo terminal de pVP2. Finalmente, para la de ~35 kDa se detectó el 74.6% y se reconocieron péptidos desde el extremo amino terminal de VP4 hasta el extremo carboxilo terminal de VP3. Estos análisis

confirman la hipótesis previa sobre la identidad de cada una de estas bandas a partir de los análisis mediante SDS-PAGE y WB (Figura 16).

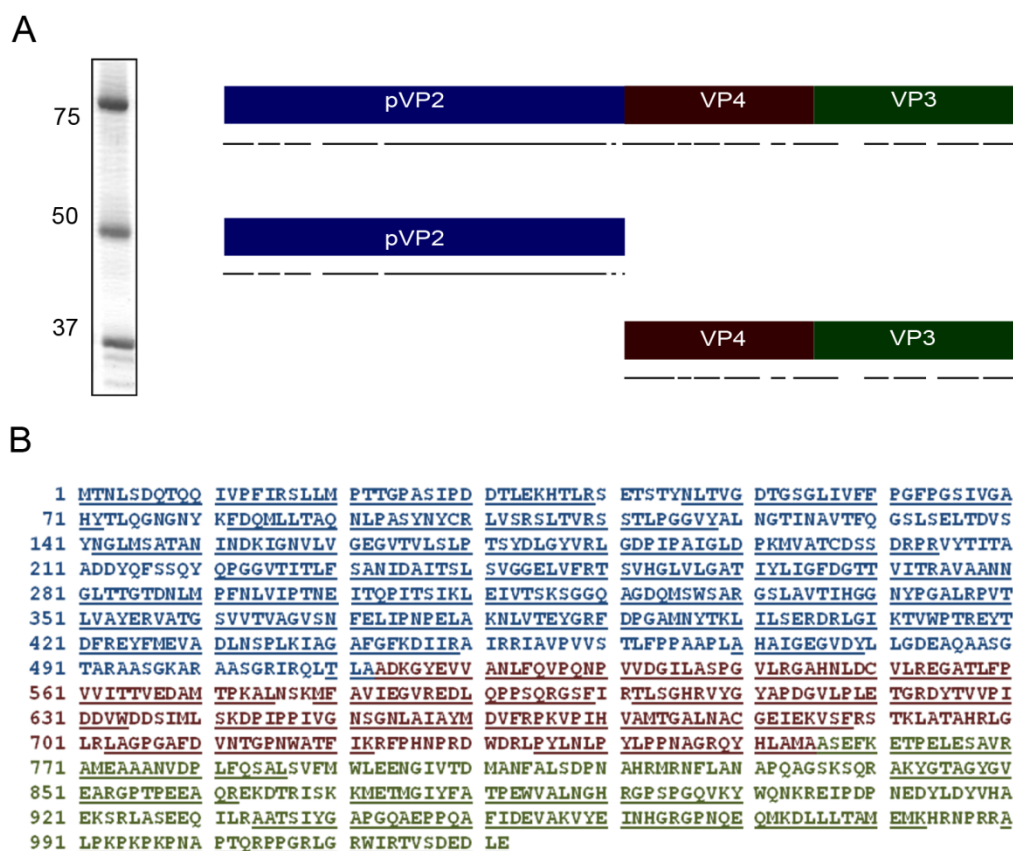


Figura 17. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de las proteínas derivadas de AcYM1-Poly. (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de una fracción representativa (fracción 6 del gradiente de sacarosa) de la expresión de AcYM1-Poly. Se indica con líneas negras sobre pVP2 (azul), VP4 (rojo) y VP3 (verde) los péptidos obtenidos por tripsina y quimotripsina detectados por MALDI-TOF/TOF (B) Localización de los péptidos detectados (subrayados) en la secuencia de la poliproteína,

Dado que las bandas de ~77, ~48 y ~35 kDa son las únicas detectadas a lo largo del gradiente, los ensamblados tubulares y las VLPs mayoritariamente esféricas que se ensamblan a partir de la expresión de AcYM1-Poly están formados por las mismas proteínas precursoras: la poliproteína viral, la forma precursora de la proteína de la cápsida pVP2, y el intermediario o proteína de fusión VP4-VP3. Las tres bandas fueron cuantificadas a partir de geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. La intensidad registrada de cada banda en cada fracción se normalizó en función de su peso molecular y se calculó la relación molar entre ellas (Figura 18). Mientras que las estructuras tubulares (fracciones 1-5) tienen una relación molar poliproteína:pVP2:VP4-VP3 de 4:4:2, en las fracciones enriquecidas con VLPs (fracciones 6-8) la relación es de 3:5:2. Este cambio es crítico porque posibilita el ensamblaje mayoritario de VLPs esféricas. Las VLPs purificadas constituidas por estas formas poco procesadas o

precursores proteicos pueden ser consideradas como procápsidas, ya que requieren una posterior maduración para transformarse en cápsidas como la de los virus infectivos de IBDV.

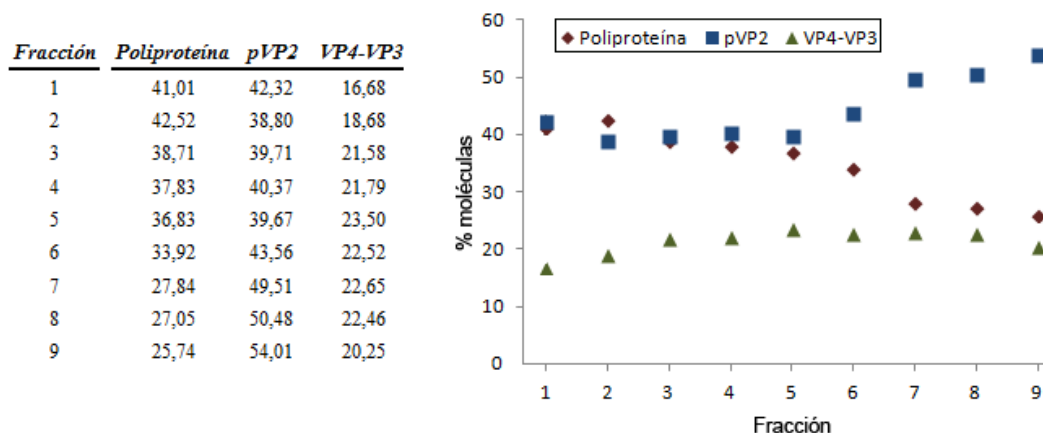


Figura 18. Relación entre las proteínas precursoras derivadas AcYM1-Poly en los ensamblados purificados en gradientes de sacarosa. Se indica las relaciones molares (expresado en porcentaje) de la poliproteína, pVP2 y VP4-VP3 en las fracciones 1-9 del gradiente de sacarosa. En la representación gráfica se aprecia la transición suave localizada en la fracción 6 (enriquecida en VLPs) donde empieza a disminuir el porcentaje de poliproteína.

4.1.6 Criomicroscopía electrónica tridimensional de las procápsidas AcYM1-Poly de IBDV

Las procápsidas purificadas a partir de AcYM1-Poly fueron analizadas mediante criomicroscopía electrónica (crio-ME) para la determinación de su estructura tridimensional. La principal ventaja de esta técnica es que permite observar a las partículas en condiciones hidratadas que reproducen fielmente su estado conformacional nativo gracias a que las muestras son sometidas a una congelación a alta velocidad denominada vitrificación. Las procápsidas de la fracción 6 del gradiente de sacarosa fueron vitrificadas y, dada la heterogeneidad estructural de los ensamblados, se seleccionaron solo las partículas de morfología esférica e icosaédrica y tamaño similares a las cápsidas T=13 de IBDV (Figura 19). Como controles se vitrificaron muestras de viriones de IBDV (no mostrado) y VLPs obtenidas como resultado de la expresión de la poliproteína de IBDV en el rVV vT7/LacOI/Poly, que tienen un marcado perfil icosaédrico como los viriones (Castón *et al.*, 2008).

Los mapas de densidad de las VLPs fueron calculados a partir de 369 imágenes de procápsidas de AcYM1-Poly (Figura 19A) y 424 de VLPs de rVV vT7/LacOI/Poly (Figura 19D), y su resolución fue estimada mediante el cálculo de la función FSC (a 0.5) en 25.0 Å y 21.2 Å respectivamente. La superficie externa de estos dos mapas muestra los elementos característicos de la cápsida de IBDV, donde se pueden distinguir los 5 tipos de trímeros que conforman la simetría T=13 *levo* (Figuras 19B y E). La comparación entre las secciones centrales de los mapas muestra que la procápsida de AcYM1-Poly tiene un grosor mayor que las VLP de vT7/LacOI/Poly, lo que se puede atribuir a la presencia de la poliproteína, de pVP2 y/o el

intermediario VP4-VP3 que dan cuenta de las proyecciones observadas hacia el interior de la procápsida (Figura 19C y F). Este incremento del grosor de la estructura también se pone claramente de manifiesto al comparar los perfiles de densidad radial de ambos mapas (Figura 19G). Para definir con mayor precisión las densidades adicionales atribuibles a las formas precursoras de la poliproteína en la procápsida de AcYM1-Poly, se calculó el mapa de diferencia entre las dos reconstrucciones mediante la sustracción aritmética de los valores de densidad normalizados de cada cápsida. Las densidades resultantes de esta operación se muestran superpuestas sobre el modelo de VLPs de vT7/LacOI/Poly en la figura 19H (en rojo), y se localizan en la superficie interna de la cápsida, concentradas mayoritariamente en el centro de las posiciones pentaméricas y también, en menor medida, en los trímeros que forman los hexámeros. Las densidades observadas en el mapa diferencia calculado darían cuenta de la porción VP4-VP3 de la poliproteína, de los extremos carboxilo terminal de pVP2 y/o del intermediario VP4-VP3 que interacciona con pVP2. Análisis estructurales de alta resolución de (p)VP2, VP4 y VP3 sugieren que los segmentos peptídicos de conexión entre ellas deben ser flexibles (Casañas *et al.*, 2008; Coulibaly *et al.*, 2005; Chung y Paetzel, 2013), y las proteínas estructurales en las formas precursoras pueden disponer de cierta movilidad. Considerando este factor, y después de imponer simetría icosaédrica a la reconstrucción de la procápsida de AcYM1-Poly se puede explicar el tamaño relativamente pequeño de la densidad diferencia.

4.1.7 Análisis de las estructuras generadas en co-infecciones de AcYM1-Poly y FB-HTVP4

Dado que los productos mayoritarios obtenidos con las infecciones de AcYM1-Poly son formas precursoras e intermediarios de la poliproteína, sugiriendo que VP4 no procesa correctamente a la poliproteína, se decidió realizar co-infecciones con AcYM1-Poly y FB-HTVP4 con el objetivo de proporcionar una fuente extra de VP4 y favorecer el procesamiento de la poliproteína. El rBV FB-HTVP4, expresa una VP4 con un tag de seis His en su extremo amino terminal. El tag de His completo incluye 52 residuos, por lo que esta versión de VP4 migra con una movilidad electroforética correspondiente a ~37 kDa, lo que permite diferenciarla de la VP4 proporcionada por AcYM1-Poly, de ~25k Da.

Después de ensayar diferentes relaciones de co-infección de los dos rBVs, controlando que ambos se expresen correctamente, las coinfecciones se realizaron a una moi de 0.5 pfu/cel para AcYM1-Poly y de 0.2, 1 y 5 pfu/cel para FB-HTVP4. De este modo se incrementaba gradualmente la cantidad de VP4 presente en las células de insecto sin bloquear la expresión de

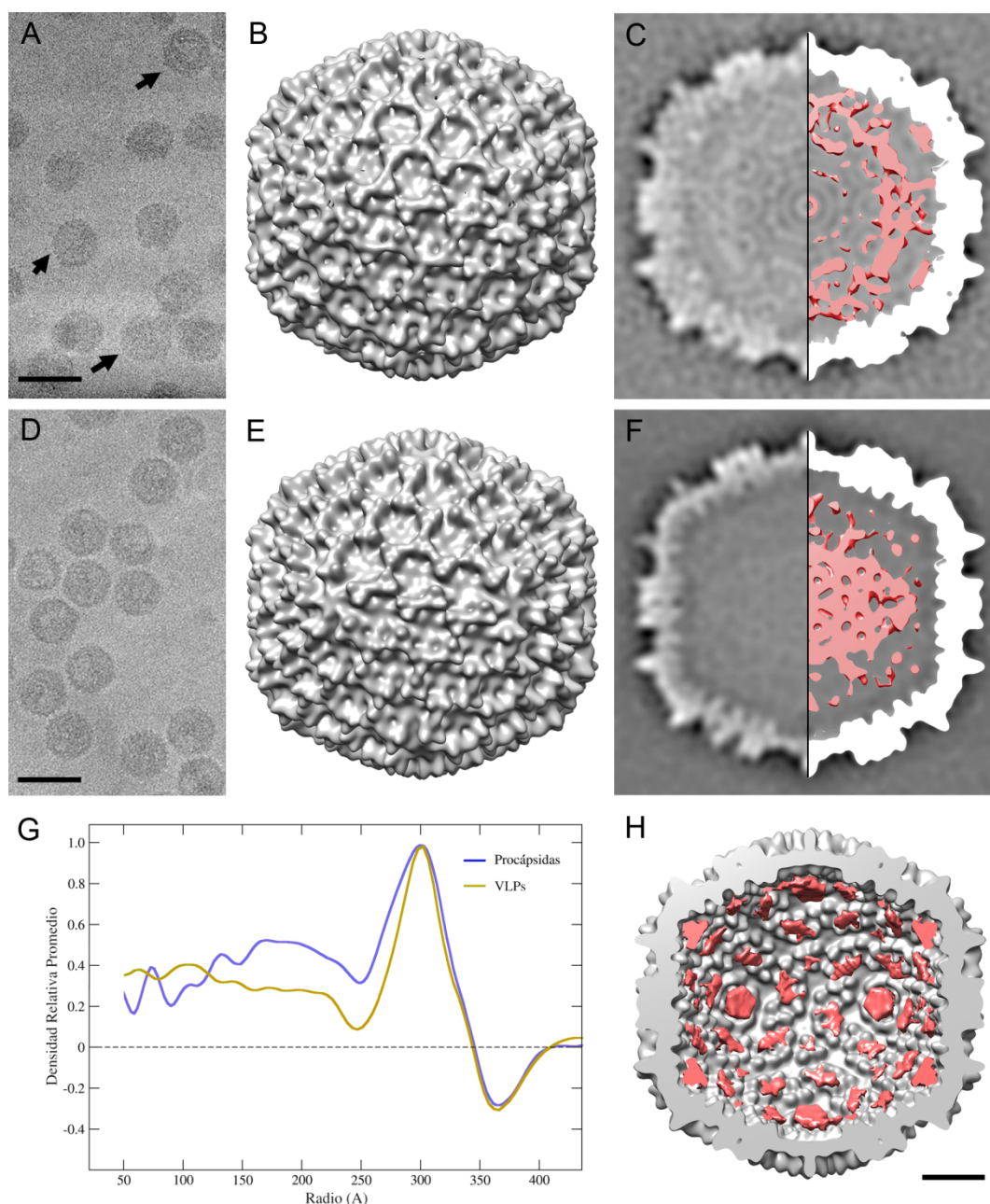


Figura 19. Criomicroscopía electrónica y reconstrucción 3D de VLPs de AcYM1-Poly y vT7/LacOI/Poly. (A) Micrografía de criomicroscopía electrónica de procápsidas de AcYM1-Poly. Las flechas indican las partículas seleccionadas para el cálculo del mapa 3D; la barra de escala representa 100 nm. (B) Superficie externa de la reconstrucción 3D de las procápsidas de AcYM1-Poly, a 25.0 Å de resolución, vista desde un eje de simetría icosaédrica de orden 2. (C) Sección central del mapa de densidad (izquierda) y umbralizada a 1 σ sobre la densidad media (derecha) (D) Criomicrografía electrónica de VLPs de vT7/LacOI/Poly. La barra de escala representa 100 nm (E) Superficie externa de la reconstrucción 3D de las VLPs de vT7/LacOI/Poly, a 21.2 Å de resolución. (F) Sección central del mapa de densidad (izquierda) y umbralizada a 1 σ sobre la densidad media (derecha). (G) Plot de densidad radial de la procápsida de AcYM1-Poly (azul) y VLPs de vT7/LacOI/Poly (amarillo). (H) Mapa diferencia entre las dos reconstrucciones de (rojo) superpuesto sobre la VLP de vT7/LacOI/Poly (gris). La barra de escala representa 10 nm.

la poliproteína. Células H5 coinfectadas fueron recogidas a 72 hpi y los extractos celulares totales fueron analizados por SDS-PAGE y WB con sueros específicos α -VP2, α -VP3 y α -VP4. El análisis de las proteínas relacionadas con VP2 indica que, mientras la poliproteína (con

una movilidad correspondiente a ~77 kDa) está presente en ausencia de una fuente adicional de VP4, la co-expresión con HTVP4 procesa la poliproteína y la única banda que se detecta, de ~48 kDa, debe corresponder con pVP2 (Figura 20A). El seguimiento de las proteínas relacionadas con VP3 muestra que la poliproteína se procesa a medida que se co-expresa con cantidades crecientes de HTVP4, incrementándose la banda que corresponde a la proteína VP4-VP3; sin embargo, este intermediario no se procesa (Figura 20B). El análisis con el suero α -VP4 también detecta el procesamiento de la poliproteína, incrementándose la banda correspondiente a VP4-VP3 y detectándose una banda adicional de mayor movilidad, que debe corresponder con formas más procesadas de VP4 (Figura 20C). En este caso también se observó el incremento de una banda de ~37 kDa que corresponde a HTVP4, como demostró el análisis mediante WB usando un suero α -His (Figura 20D).

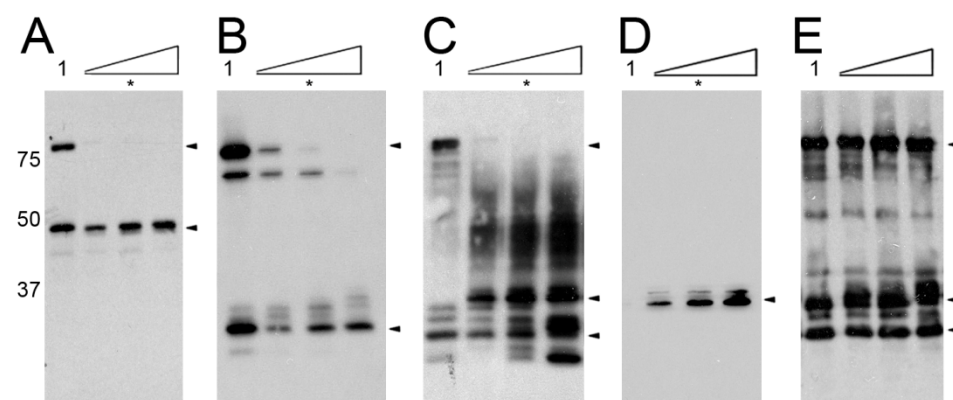


Figura 20. Efecto de la co-infección de AcYM1-Poly con FB-HTVP4. Análisis mediante SDS-PAGE y WB de células H5 co-infectadas con AcYM1-Poly (moi 0.5 pfu/cel) y FB-HTVP4 (moi 0.2, 1 y 5 pfu/cel, de izquierda a derecha) revelado con un suero (A) α -VP2, (B) α -VP3, (C) α -VP4 y (D) α -His. (E) Co-infección de AcYM1-Poly con FB-HTVP4-K180A analizada mediante SDS-PAGE y WB revelado con un suero α -VP4. El carril 1 corresponde a una infección con AcYM1-Poly. Las flechas indican las posiciones de (A-E) la poliproteína de AcYM1-Poly, (A) pVP2, (B) intermediario VP4-VP3, (C) HT-VP4 e intermediario VP4-VP3, (D) HT-VP4, y (E) HT-VP4 e intermediario VP4-VP3. La co-infección seleccionada para purificar los ensamblados resultantes es indicada con un asterisco.

Para confirmar que el cambio en el patrón electroforético de proteínas en la co-infección se debe exclusivamente a la actividad proteolítica de VP4 proporcionada por FB-HTVP4, se generó un rBV que expresa un mutante de VP4 con el residuo Lys180 del sitio activo sustituido por una Ala (HTVP4-K180A). Se realizó una co-expresión de AcYM1-Poly y FB-HTVP4-K180A y los extractos celulares fueron analizados mediante WB con un suero α -VP4. En este caso, la banda de ~77 kDa correspondiente a la poliproteína, no era procesada (Figura 20E). En resumen, en co-infecciones de AcYM1-Poly y FB-HTVP4 el mayor procesamiento de la poliproteína es debido exclusivamente a unos niveles intracelulares más altos de la forma activa de VP4, si bien el intermediario VP4-VP3 apenas se procesa.

Una vez establecido que la co-infección de AcYM1-Poly con FB-HTVP4 genera el procesamiento de los intermediarios, se co-infectaron células H5 en una relación de AcYM1-Poly: FB-HTVP4 de 0.5:5 y se recogieron a las 72 hpi para analizar las estructuras resultantes que se purificaron en gradientes de sacarosa como se ha descrito anteriormente (apartado 3.4.1). El perfil bioquímico del gradiente de sacarosa indica la presencia de una banda mayoritaria con una movilidad similar a la de pVP2 (Figura 21A), muy distinto del que resulta de la expresión de AcYM1-Poly (Figura 15A). El análisis por microscopia electrónica y tinción negativa de las fracciones también mostró importantes diferencias (Figura 21B-F). Las fracciones inferiores 3 y 5 están constituidas mayoritariamente por estructuras tubulares (Figura 21B y C), las fracciones centrales como la fracción 7 por tubos cortos y cápsidas lábiles que aparecen parcialmente desestructuradas (Figura 21D), y las fracciones superiores 9 y 11 por tubos cortos y agregados proteicos irregulares (Figura 21E y F). Las estructuras ensambladas a partir de la co-expresión de AcYM1-Poly y FB-HTVP4 son variadas, con una disminución notable de estructuras con apariencia de cápsida y/o procápsida, pero en estas condiciones tampoco se recupera el patrón bioquímico y estructural de las infecciones con FB-Poly (Figuras 14A y C).

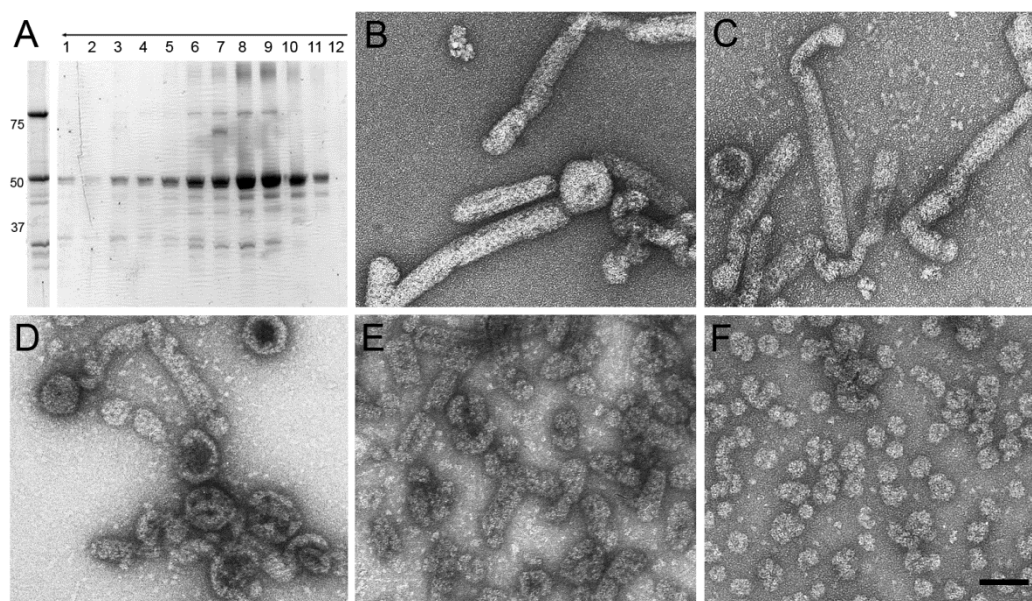


Figura 21. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la co-expresión de AcYM1-Poly y FB-HTVP4. (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas en la purificación en el gradiente de sacarosa de los ensamblados derivados de la expresión de AcYM1-Poly y rBV-HTVP4. La flecha superior en el gradiente indica la dirección de sedimentación. La fracción 6 enriquecida en procápsidas de AcYM1-Poly se muestra a la izquierda junto con los marcadores de peso molecular en kDa. (B-F) Análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de las fracciones (B) 3, (C) 5, (D) 7, (E) 9 y (F) 11 del gradiente. La barra de escala corresponde a 100 nm

4.1.8 Análisis de la secuencias peptídicas de FB-Poly y AcYM1-Poly

En el contexto de AcYM1-Poly, VP4 procesa parcialmente la poliproteína en la región entre pVP2 y VP4 mientras que el procesamiento entre VP4 y VP3 es prácticamente nulo. Sin

embargo, en el contexto de FB-Poly, VP4 procesa eficientemente la poliproteína para rendir pVP2, VP4 y VP3 (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000). Para determinar si las secuencias de la poliproteína en ambos rBVs son idénticas, éstas fueron secuenciadas de nuevo y se compararon con la secuencia original de la cepa Soroa (nº de acceso AF140705). El alineamiento de secuencias de los rBVs y la cepa de Soroa mostró cuatro cambios puntuales en la secuencia de AcYM1-Poly con respecto a la secuencia original (Figura 22). Dos de estos cambios se localizan hacia la región carboxilo terminal de VP3 y también están presentes en FB-Poly. AcYM1-Poly y FB-Poly comparten también la sustitución Ala485Asp; la única diferencia entre ambos es la sustitución Arg505His en AcYM1-Poly. Estos dos cambios puntuales de la región carboxilo terminal de pVP2 se localizan muy próximos a dianas de VP4, el enlace Ala487-Ala488, Ala494-Ala495, Ala501-Ala502 y Ala512-Ala513. Estos resultados sugieren que el contexto de los sitios de procesamiento es crítico para la actividad de VP4; mientras que la sustitución Ala485Asp desplaza el ensamblaje hacia formas tubulares, la sustitución Arg505His compensa parcialmente este cambio y, además de las formas tubulares, se recuperan estructuras similares a procápsidas.

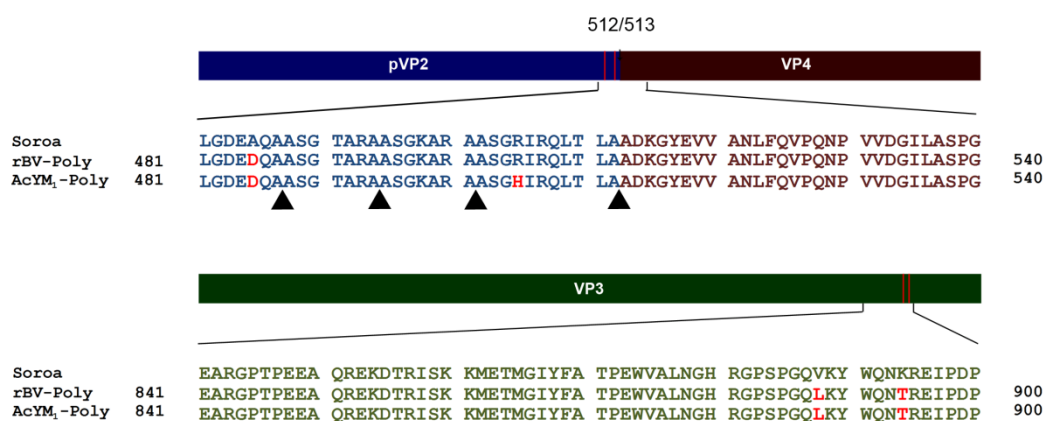


Figura 22. Alineamiento de las secuencias de la poliproteína de IBDV (cepa Soroa), FB-Poly y AcYM1-Poly. Los residuos de pVP2 se muestran en azul, VP4 en marrón y VP3 en verde. Los cambios puntuales se indican en rojo. Los sitios de procesamiento de VP4 en la región carboxilo terminal de pVP2 (enlaces 487-488, 494-495, 501-502 y 512-513) se indican con triángulos.

4.1.9 Efecto de la sustitución R505H en el ensamblaje de la cápsida de IBDV

Para comprobar que la sustitución R505H es crítica para el ensamblaje de la cápsida de IBDV, se generó el rBV BF-Poly-R505H que incorpora esta mutación puntual en pVP2, y células H5 fueron infectadas a una moi 1-2 pfu/cel, fijadas a 48 hpi y procesadas para su análisis por IF con α -VP2, α -VP3 y α -VP4. La expresión de FB-Poly-R505H genera un patrón de distribución subcelular difuso tanto para VP2 como VP3, aunque parte de VP2 sigue un patrón tubular. Sin embargo, VP3 sólo colocaliza con VP2 en estructuras de aspecto circular (Figura 23A-C). VP4 posee un patrón tubular que rodea al núcleo y no colocaliza con VP2 (Figura 23D-F).

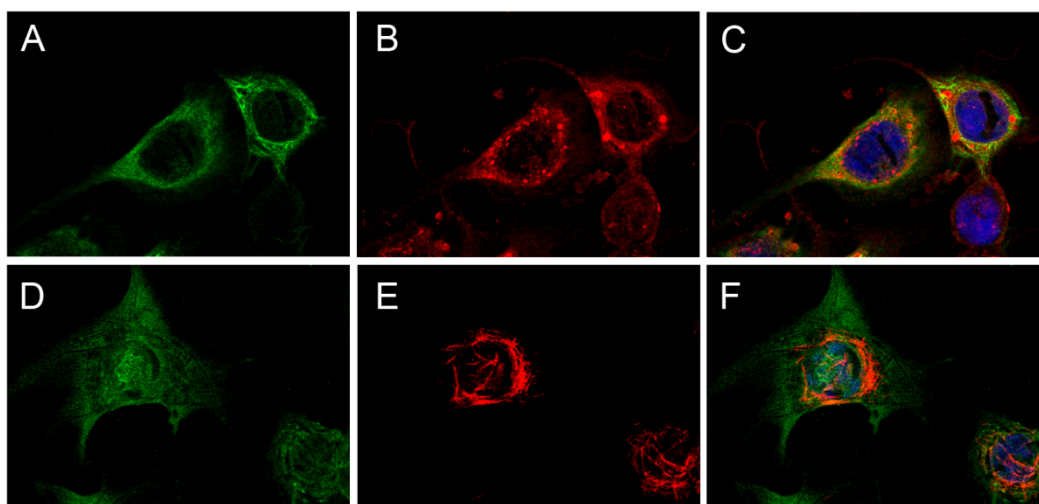


Figura 23. Análisis por IF de la expresión de la poliproteína de IBDV con FB-Poly-R505H. (A-F) Análisis por IF de células H5 infectadas con FB-Poly-R505H a 48 hpi incubadas con anticuerpos específicos (A, D) α -VP2, (B) α -VP3 y (E) α -VP4 y posteriormente con anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). (C y F) Análisis de colocalización mediante la superposición de las imágenes A y B, y de las imágenes D y E, respectivamente. Los núcleos se muestran en azul mediante tinción con DAPI

Puesto que los patrones de distribución celular de las proteínas estructurales para FB-Poly y FB-Poly-R505H son notablemente distintos, se realizaron infecciones a escala semipreparativa en célula H5 infectadas durante 72 h con FB-Poly-R505H (moi 1-2 pfu/cel), y los ensamblados resultantes fueron purificados por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Las células fueron recogidas a las 72 hpi ya que el efecto citopático a las 48 hpi es muy reducido, al igual que en las infecciones con AcYM1-Poly. La figura 24A muestra el perfil bioquímico de las fracciones del gradiente analizadas por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie: los ensamblados se localizan fundamentalmente en la zona central del gradiente y están constituidos por dos proteínas mayoritarias de ~48 kDa y ~30 kDa. El análisis de las fracciones centrales (en este caso la fracción 8) mediante WB con sueros α -VP2, α -VP3 y α -VP4 muestra que la proteína de ~48 kDa se corresponde con pVP2 y la de ~30 kDa con VP3; también se detectó la presencia de VP4 (Figura 24B). El análisis por microscopía electrónica y tinción negativa muestra que las fracciones de la parte inferior del gradiente están constituidas por estructuras tubulares flexibles (Figura 24C), las fracciones de la región central contienen, además de estructuras tubulares, VLPs con un marcado contorno icosaédrico (Figura 24D-F), y las fracciones de la parte superior del gradiente muestran agregados pequeños y de forma indefinida (no mostrado). Estos resultados confirman la importancia de la sustitución R505H ya que se recupera parcialmente el ensamblaje de cápsidas similares a las del virión en la expresión de la poliproteína de IBDV a partir de cualquiera de los dos sistemas de rBV usados en este trabajo.

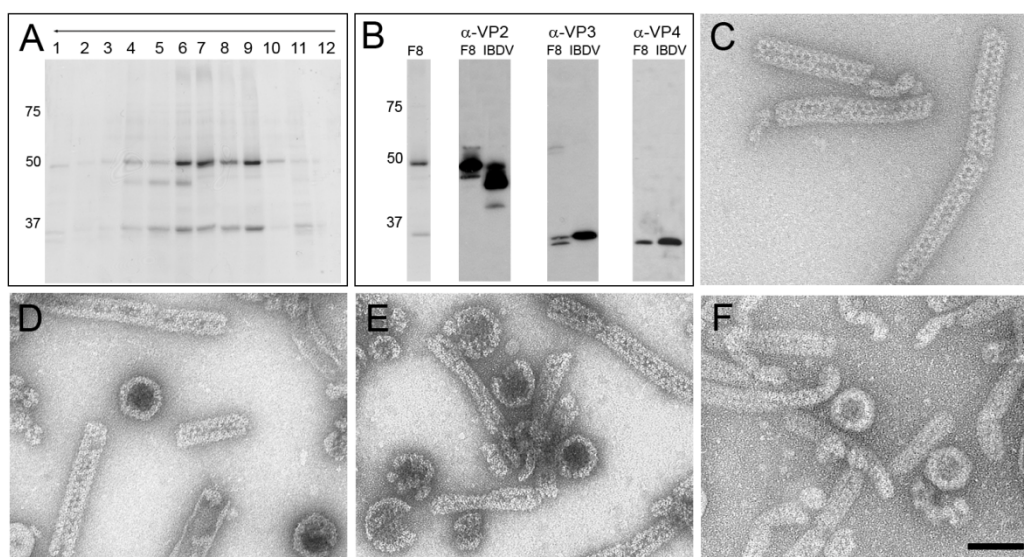


Figura 24. Análisis de las estructuras obtenidas a partir de la expresión de FB-PolyR505H. (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas en la purificación en el gradiente de sacarosa de los ensamblados derivados de la expresión de FB-PolyR505H. La flecha superior en el gradiente indica la dirección de sedimentación. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. (B) Análisis de la fracción 8 (F8) mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (izquierda) o WB con los sueros específicos α -VP2, α -VP3 y α -VP4. Se incluye un control de IBDV. (C-F) Análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de las fracciones (C) 4, (D) 6, (E) 7 y (F) 8 del gradiente. La barra de escala corresponde a 100 nm

4.2 Caracterización estructural y funcional de la proteasa viral VP4

4.2.1 Expresión y purificación de VP4 en *E. coli* y células de insecto

El gen completo VP4, en ausencia y presencia de un tag de His unido covalentemente en su extremo amino terminal, fue clonado y expresado en *E. coli* BL21(DE3)pLysS, con el objetivo inicial de generar un suero α -VP4. La purificación se realizó según se indica en el apartado 3.4.4. Básicamente, HT-VP4, de ~35 kDa se acumula en agregados insolubles en las bacterias inducidas, y este precipitado fue tratado dos veces con el detergente neutro Triton X-100 al 2% (TX-100) en el tampón 20 mM Na_2HPO_4 , pH 7.83, 500 mM NaCl, 5 mM DTT para eliminar la mayor cantidad posible de otros contaminantes (Figura 25A). Seguidamente este proceso fue repetido mediante solubilizaciones con el detergente aniónico SDS a distintas concentraciones y temperaturas, y se seleccionó la incubación con SDS al 0.1% a temperatura ambiente, ya que la mayor parte de VP4 permanece insoluble y prácticamente libre de contaminantes (Figura 25B). Esta preparación de HT-VP4 fue usada como antígeno en las inmunizaciones de conejos para obtener sueros específicos α -VP4.

Dada la pureza de la fracción de HT-VP4, ésta fue analizada por microscopía electrónica y tinción negativa; la proteína HT-VP4 está formando unas estructuras tubulares de ~25 nm de

diámetro (Figura 24C), con la misma morfología y diámetro que los tubos tipo II de VP4 en células QM7 infectadas con IBDV que co-purifican con los viriones (Figura 24D). La expresión del FB-HT-VP4 (*moi* 1-2 pfu/cel) en células H5 durante 48 h da lugar a la formación de los mismos ensamblados tubulares (Figura 24E). La expresión de VP4 sin el tag de His también forma los mismos ensamblados tubulares y, dado el alto rendimiento del protocolo de purificación así como su relativa facilidad de obtención, decidimos usar esta fracción de VP4 sin el tag de His para su caracterización estructural mediante crio-ME y reconstrucción tridimensional

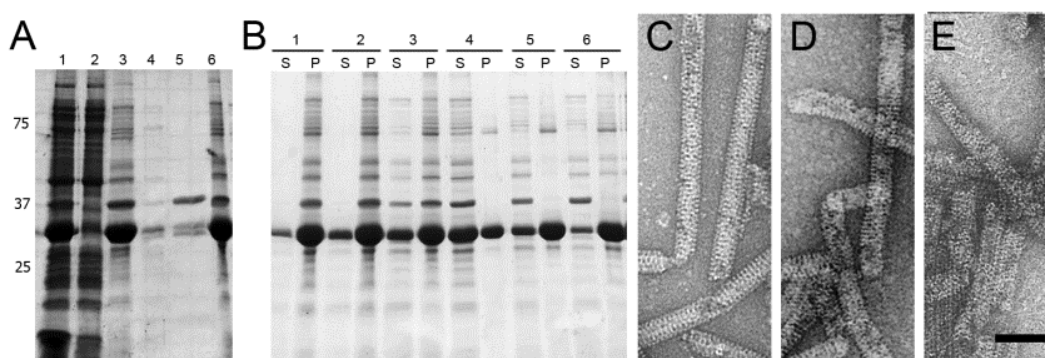


Figura 25. Expresión y purificación de HT-VP4 en *E. coli* BL21. (A) Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de bacterias transformadas con el plásmido pRSET-HTVP4 e inducidas con IPTG durante 4 h a 37 °C. Las bacterias fueron lisadas y el precipitado celular tratado dos veces con TX-100. Fracciones: (1) Bacterias totales de partida; (2, 3) Sobrenadante y precipitado insoluble obtenido después de la lisis bacteriana, respectivamente; (4, 5) Sobrenadantes de la primera y segunda incubación con TX-100, respectivamente, (6) Fracción insoluble después de las incubaciones con TX-100. (B) Análisis por SDS-PAGE de los tratamientos con SDS para eliminar proteínas contaminantes de VP4. Se indican los sobrenadantes (S) y precipitados (P) obtenidos después de las diversas incubaciones durante 1 h con SDS: (1) SDS al 0.01 %, 37 °C; (2) SDS al 0.02 %, 37 °C; (3) SDS al 0.05 %, 37 °C; (4) SDS al 0.1 %, 4 °C; (5) SDS al 0.1 %, 20 °C; (6) SDS al 0.1 %, 4 °C. (C-E) Análisis por microscopía electrónica y por tinción negativa de (C) la fracción enriquecida en HT-VP4 obtenida después de la incubación con SDS al 0.1 % a 20 °C, (D) estructuras tubulares de VP4 observadas en células QM7 infectadas con IBDV, (E) tubos de HT-VP4 purificados a partir de células H5 infectadas con FB-HTVP4. La barra de escala corresponde a 50 nm.

4.2.2 Optimización de las preparaciones de VP4 para crio-ME

Los ensamblados tubulares de VP4 de origen bacteriano se encuentran mayoritariamente formando agregados, y a penas se distinguen tubos individuales que puedan ser seleccionados para su análisis estructural (Figura 26A). Estos agregados tubulares fueron sometidos a distintos tratamientos con etilenglicol y la trehalosa que evitan su aglomeración debido a que alteran la tensión superficial del agua que las rodea (Jain y Roy, 2009). La fracción insoluble en TX-100 y SDS con un alto contenido en tubos de VP4 fue tratada con distintas concentraciones de etilenglicol o trehalosa, temperaturas y tiempos de incubación. Posteriormente se centrifugó en una microfuga a 13,000 rpm durante 1 min, y los sobrenadantes obtenidos se analizaron mediante microscopía electrónica y tinción negativa pero la aglomeración de los tubos de VP4

persiste en las condiciones analizadas (Figura 26B). Finalmente los agregados de los tubos de VP4 fueron dializados frente a distintas concentraciones del tampón de borato sódico durante 16 h a 4°C (Shubhada y Sundaram, 1993). El análisis por microscopía electrónica y tinción negativa mostró que la diálisis frente al tampón 50 mM de borato sódico, pH 8.47 disgrega los cúmulos de tubos de VP4 de manera eficiente para ser analizados por crio-ME (Figura 26C).

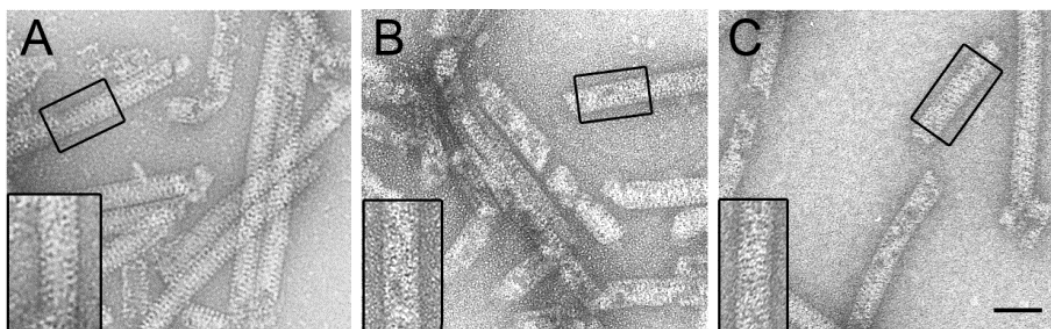


Figura 26. Optimización de las fracciones de VP4 para su análisis por crio-ME. Fracciones de VP4 de origen bacteriano fueron sometidas a distintos tratamientos y analizadas por microscopía electrónica y tinción negativa. (A) Fracción de partida mostrando la típica agregación lateral de los tubos de VP4. (B) Fracción de VP4 tratada con trehalosa al 2.5%, a 4°C 1 h. (C) Fracción de VP4 dializada frente a 50 mM de borato sódico, pH 8.47, a 4°C 16 h. Los insertos corresponden a los tubos de VP4 indicados. La barra de escala corresponde a 50 nm.

4.2.3 Crio-ME y análisis por sombreado metálico de la estructura helicoidal de VP4

Los tubos de VP4 purificados y dializados frente al tampón borato sódico fueron vitrificados y analizados mediante crio-ME. La visualización directa de imágenes de crio-ME muestra una población de filamentos de aspecto relativamente rígido, con un diámetro homogéneo de ~25 nm y una longitud variable desde ~100 nm hasta ~1 μ m (Figura 27A). A partir de 80 micrografías, libres de astigmatismo y deriva mecánica, 609 estructuras tubulares fueron seleccionadas y extraídas. El análisis del patrón de difracción de dichos filamentos muestra dos líneas de puntos difracción, o *layer lines*, a frecuencias de $\sim 1/55 \text{ \AA}^{-1}$ and $\sim 1/27 \text{ \AA}^{-1}$ (Figura 27A, recuadro). Dado el diámetro de la partícula helicoidal, la posición del punto de difracción más cercano al meridiano de la transformada de Fourier es únicamente compatible con un orden de Bessel 3, aunque no es posible diferenciar si cada una de estas *layer lines* corresponden a un orden $n=+3$ (dextrógiro) o $n=-3$ (levógiro).

Con el fin de determinar la mano de los tubos de VP4, éstos fueron analizados simultáneamente con el fago T4 (como referencia interna) mediante sombreado metálico con Pt/C (Figura 27B y C). La cola del fago T4 (Figura 27C y D, recuadros) es una estructura helicoidal dextrógira con un orden de Bessel $n=+6$ y con una elevación axial de 40.6 \AA ($n=0$) (Kostyuchenko *et al.*, 2005; Lepault y Leonard, 1985). El patrón de difracción de los tubos sombreados de VP4 presenta un único máximo de difracción a una frecuencia de $\sim 1/55 \text{ \AA}^{-1}$ (Figura 27B, recuadro), con el mismo

signo que el máximo $n=+6$ a $\sim 1/142 \text{ \AA}^{-1}$ en el patrón de difracción de la cola de T4 sombreada (Figura 27C, recuadro), implicando que se corresponde a un orden $n=+3$. Por tanto, el tubo de VP4 es una hélice dextrógira formada por tres hebras relacionadas por simetría C3 alrededor el eje azimutal de la hélice, y queda definido por dos vectores a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$ y $1/27 \text{ \AA}^{-1}$, con órdenes de Bessel $n=+3$ y $n=-3$ (Figura 27E).

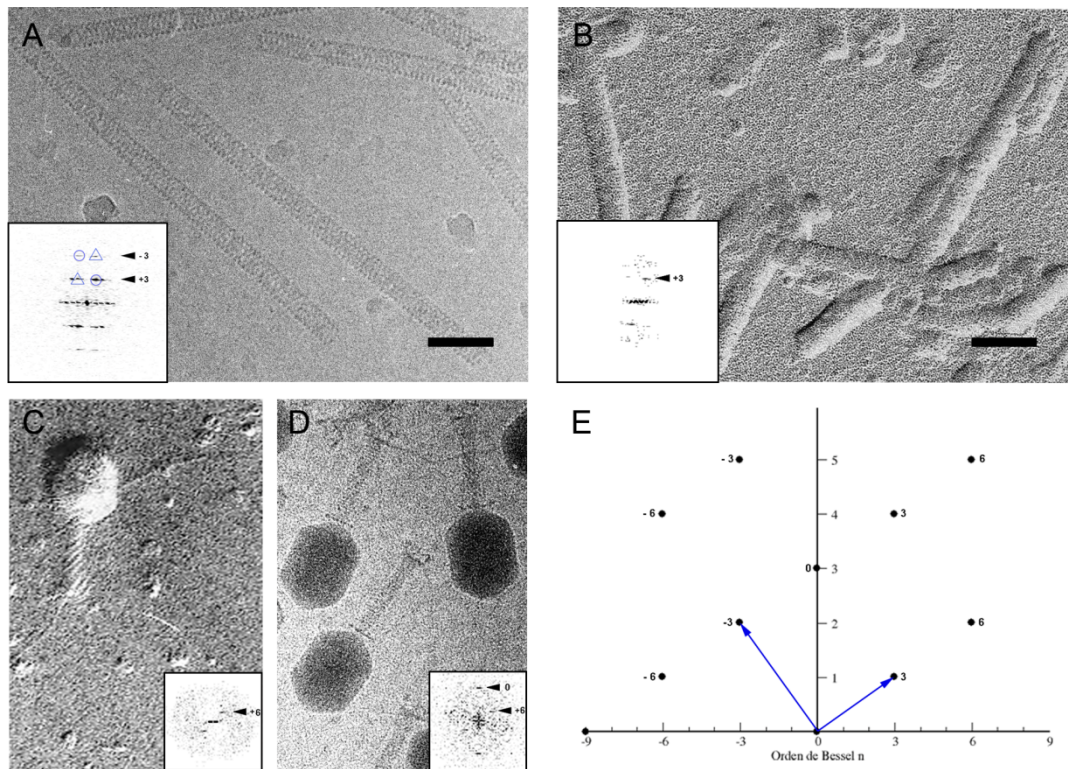


Figura 27. Anotación de la red helicoidal del tubo de VP4. (A) Criomicrografía electrónica de filamentos de VP4. La barra de escala corresponde a 50 nm. El recuadro muestra el patrón de difracción de un tubo. Las puntas de flecha indican el orden de Bessel de cada *layer line*: $n=+3$ a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$ y $n=-3$ a $1/27 \text{ \AA}^{-1}$. Se indican los vectores básicos para la anotación de las caras superior (círculos) e inferior (triángulos) del tubo de VP4. (B) Análisis mediante microscopía electrónica y sombreado metálico de tubos de VP4. El recuadro muestra el patrón de difracción y la punta de flecha indica el orden de Bessel de la *layer line* visible en el patrón, $n=+3$ a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$. (C, D) Análisis mediante (C) sombreado metálico y (D) crio-ME del fago T4. Los recuadros muestran los respectivos patrones de difracción. Las puntas de flecha indican el orden de Bessel de la *layer line* (C) $n=+6$ a $1/142 \text{ \AA}^{-1}$ y (D) $n=+6$ a $1/142 \text{ \AA}^{-1}$ y $n=0$ a $1/40.5 \text{ \AA}^{-1}$. (E) Anotación de la red helicoidal para una cara del tubo de VP4. Las flechas azules indican los vectores básicos de la red.

4.2.4 Reconstrucción tridimensional de la estructura helicoidal de VP4

Los parámetros estimados de la red helicoidal de VP4 se resumen en un paso de rosca de 165 \AA/vuelta ($3 \times 55 \text{ \AA}^{-1}$) y, dada una elevación axial de 18 \AA (presencia de $n=0$ a $1/18 \text{ \AA}^{-1}$, ver más abajo), un ángulo de rotación por subunidad de $\sim 40^\circ$. La reconstrucción 3D de los tubos de VP4 se realizó siguiendo el procedimiento de iterativo de reconstrucción helicoidal en espacio real (IHRSR) (Egelman, 2010). Como referencia inicial para la determinación del origen y orientación de los 23,068 segmentos solapantes de $\sim 46 \text{ nm}$ de largo se usó un cilindro hueco con las dimensiones del tubo de VP4. Partiendo de los parámetros estimados de la hélice de

VP4 el algoritmo IHRSR converge rápidamente a un valor de 40.6° de rotación por subunidad y una elevación axial de 18.4 \AA (Figura 28).

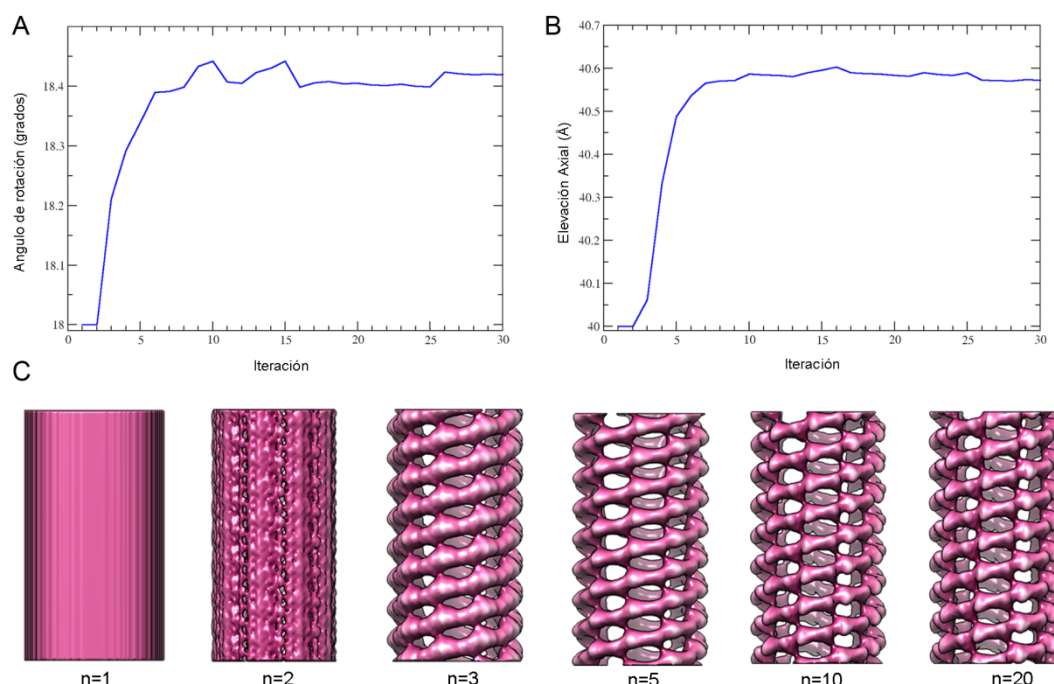


Figura 28. Análisis de convergencia de los parámetros de simetría helicoidal del tubo de VP4. (A, B) Determinación de los valores del (A) ángulo de rotación y (B) elevación axial para las 30 primeras iteraciones del procedimiento IHRSR. (C) Reconstrucciones 3D iniciales de los tubos de VP4 tras imponer los parámetros de simetría helicoidal obtenidos en las 20 primeras iteraciones.

La anotación seguida de la red helicoidal implica la presencia de una *layer line* con una posición meridional ($n=0$) a una frecuencia de $1/18 \text{ \AA}^{-1}$. Efectivamente, el patrón de difracción promedio de los segmentos parcialmente solapantes de los tubos de VP4 presenta, además de las difracciones a $1/55 \text{ \AA}^{-1}$ y $1/27 \text{ \AA}^{-1}$, líneas adicionales a $1/18 \text{ \AA}^{-1}$ y $1/13 \text{ \AA}^{-1}$, y el punto a $1/18 \text{ \AA}^{-1}$ es meridional, lo que confirma la anotación propuesta para la red (Figura 29A). Durante el proceso de refinamiento de los parámetros helicoidales quedó establecido que, además de la simetría C_3 alrededor el eje azimutal de la hélice, existe una simetría diédrica perpendicular al eje azimutal que también fue impuesta en la reconstrucción final.

El mapa de densidad generado tiene una resolución de 8.8 y 7.6 \AA , en base a los criterios de FSC 0.5 y 0.3 , respectivamente (Figura 29B). El mapa 3D del tubo de VP4 es un cilindro hueco, con un diámetro externo de 246 \AA y un diámetro interno de 122 \AA , formado por tres hebras que dejan numerosos poros entre sí (Figura 29C). El protómero del tubo es un dímero de VP4 que puede ser visualizado usando diferentes niveles de umbralización. En principio se pueden definir tres tipos de dímeros, denominados I, II y III, entre las subunidades adyacentes (Figura 29C, rectángulos rojos discontinuos). Los dímeros I y II son compactos y muestran numerosas interacciones entre los monómeros, por lo que están más favorecidos que el dímero III pero,

teniendo en cuenta estudios previos (Chung y Paetzel, 2011; Chung y Paetzel, 2013; Feldman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007) y nuestros subsiguientes análisis estructurales y funcionales, el dímero I es probablemente el dímero natural de VP4.

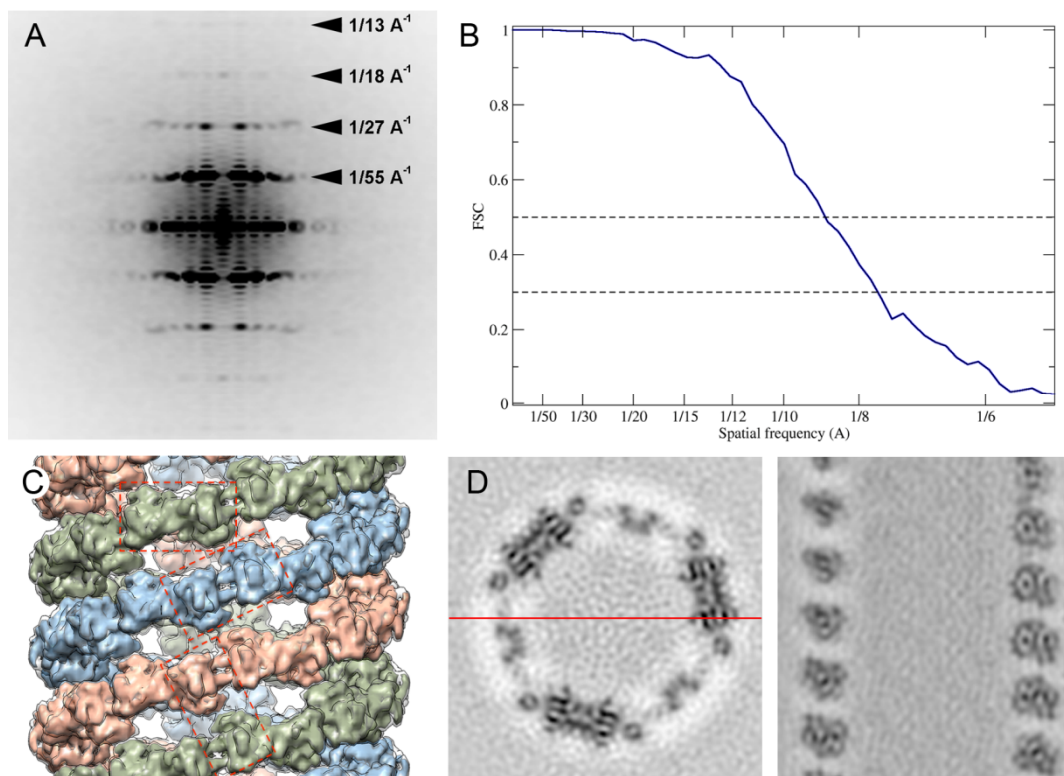


Figura 29. Estructura tridimensional del tubo de VP4. (A) Patrón de difracción promedio obtenido a partir de 23,068 segmentos solapantes de filamentos de VP4 (~46 nm de largo). Se indican las frecuencias en las que se detectan *layer lines*. (B) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas negras indican los valores de FSC a 0.5 y 0.3 para los cuales se obtienen resoluciones de 8.8 y 7.6 Å, respectivamente. (C) Estructura tridimensional del tubo con simetría helicoidal de VP4. Las tres hélices principales que conforman la hélice se muestran en azul, naranja y verde. Los tres tipos posibles de dímeros de VP4 son indicados: I (verde), II (azul) y III (naranja y verde). El mapa se muestra a un umbral de 2σ sobre la densidad media. (D) Secciones centrales transversal (izquierda) y longitudinal (derecha) al eje azimutal del mapa de densidad del tubo de VP4. La línea roja sobre la sección transversal indica la posición de la sección longitudinal mostrada.

La resolución obtenida en el mapa de crio-ME permite visualizar la unidad estructural básica con simetría de orden en una sección transversal, así como numerosas densidades con una morfología tubular o laminar (Figura 29D) que se corresponden con elementos de estructura secundaria.

Analizando la estructura tridimensional del tubo generado se pueden diferenciar claramente las tres hélices principales que lo conforman (Figura 30A y B) las cuales poseen una elevación axial igual a 18.4 Å y un ángulo de rotación de 40.6°. Estos datos fueron calculados a partir del listado de los puntos de la red helicoidal, considerando las *layer lines* y sus órdenes de Bessel y a su vez fueron empleados como parámetros iniciales en el proceso iterativo de IHRSR, que

permitió imponer y refinar los parámetros de simetría helicoidal del modelo inicial. A partir de este mapa se segmentó un dímero de VP4 (Figura 30C), y se procedió a realizar una predicción de elementos de estructura secundaria (SSE) obteniéndose un modelo donde claramente se obtienen 6 hélices α y 10 láminas β , así como una cavidad en forma de Y en cada subunidad.

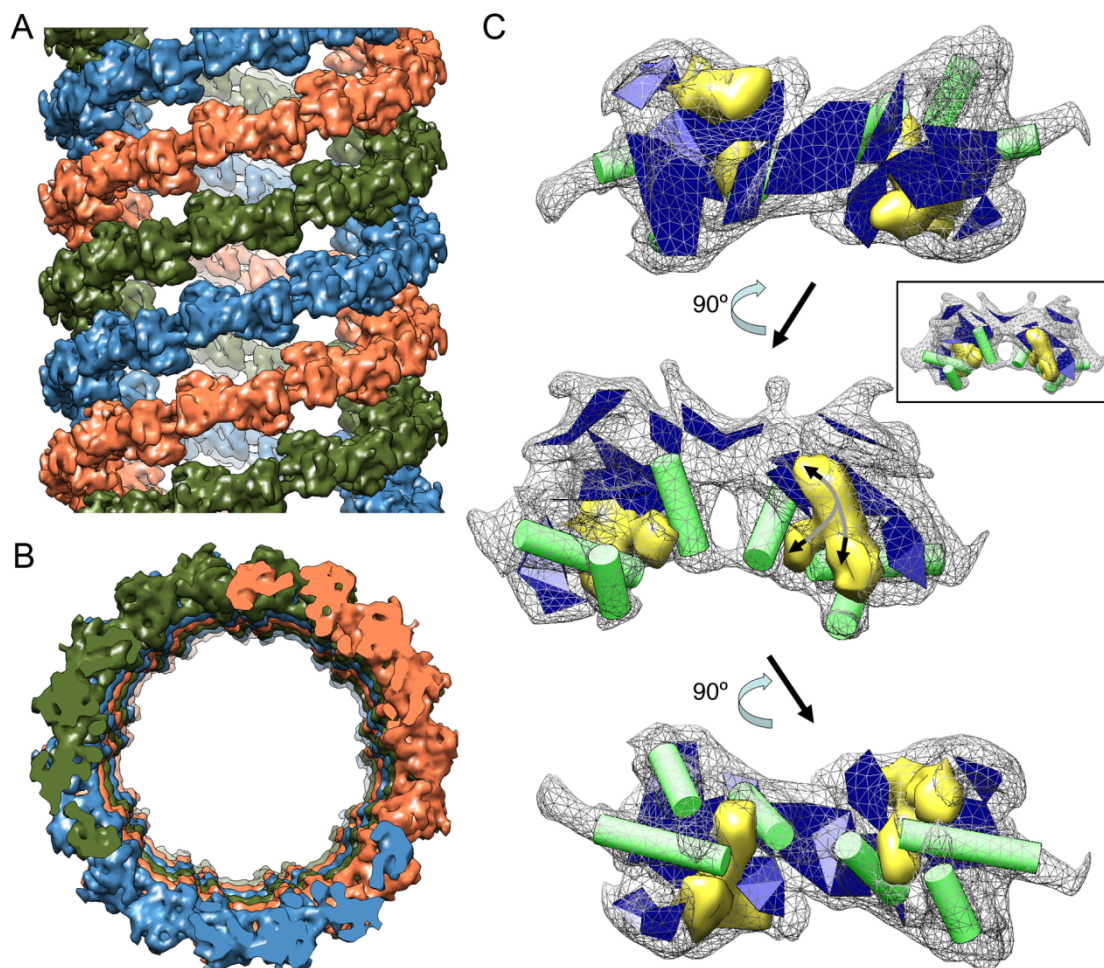


Figura 30. Estructura tridimensional de los tubos de VP4 y predicción de estructuras secundarias. (A y B) 3DR de los tubos de VP4 vistos perpendicular y a lo largo del eje azimuthal (C) Segmentación del dímero de VP4 con predicción de elementos de estructura secundaria a partir del mapa de densidades. Los cilindros verdes se corresponden con hélices α , las superficies planares azules con láminas β y el volumen amarillo indica una cavidad interna detectada en cada monómero de VP4. El inserto muestra una vista de dímero inclinado 35° con respecto al eje Y.

4.2.5 Modelo pseudo-atómico de la estructura helicoidal de VP4

El modelo pseudo-atómico de la proteasa de IBDV fue generado a partir del núcleo común de las proteasas de birnavirus descritas hasta la fecha. El alineamiento de secuencia y estructura secundaria de las cinco proteínas (Figura 31) muestra que a pesar de poseer muy poca homología en su secuencia, su estructura secundaria se encuentra altamente conservada y las 3 hélices α , que forman parte o se localizan cerca del sitio activo en los modelos atómicos descritos, son predichas para IBDV. En las cinco proteínas, los aminoácidos relacionados con la

actividad catalítica (Ser y Lys) y los encargados de neutralizar y facilitar el procesamiento de la poliproteína (Pro, Thr y Gly) se encuentran presentes y formando parte de las mismas estructuras.

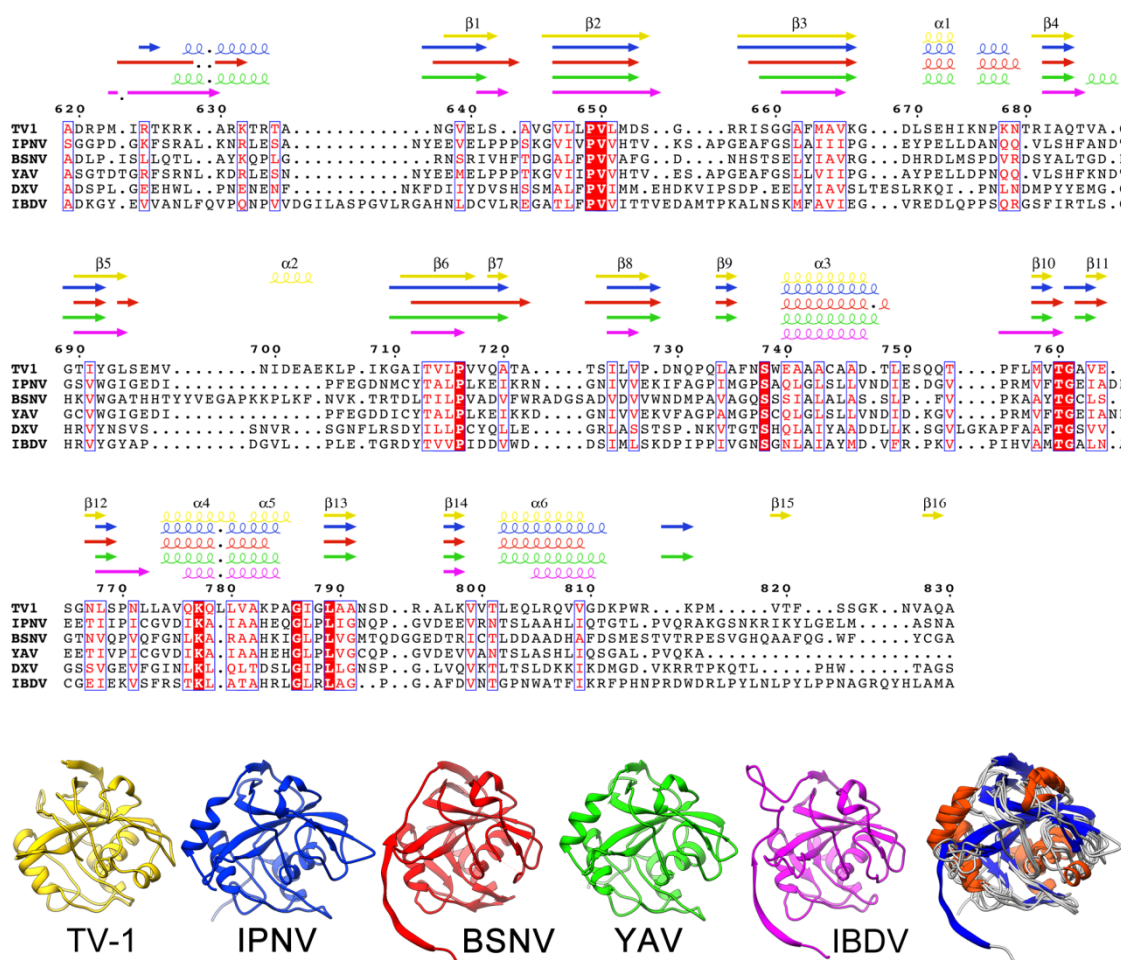


Figura 31. Alineamiento de secuencia y SSE de las VP4 de birnavirus. Se representa la SSE de TV-1 (amarillo) IPNV (azul) BSNV (rojo) YAV (verde) e IBDV (morado) junto con el alineamiento de sus secuencias. Las flechas representan cadenas β y las espirales hélices α . Los residuos idénticos están resaltados en blanco con fondo rojo, y los residuos equivalentes están representados en rojo. Abajo se representan las 4 estructuras atómicas de VP4 descritas hasta la fecha y la predicción de estructura de IBDV hecha a partir del consenso; asimismo se muestra la superposición de las 5 estructuras indicándose las hélices α en rojo y las laminas β en azul.

El modelo pseudo-atómico de IBDV fue ajustado con el mapa de crio-ME considerando sólo el núcleo común de las distintas estructuras de VP4, y eliminando los extremos amino y carboxilo terminal por ser las zonas de mayor variabilidad. El dímero generado fue ajustado de modo flexible puesto que las hélices α estaban desplazadas respecto a sus densidades en el mapa de crio-ME (Figura 32A y B). Para realizar este ajuste, se tomaron en consideración las posiciones de los residuos catalíticos y de aquellos implicados en la estabilización del sustrato se alteraron lo menos posible (Figura 32C); además la horquilla β del segmento 52-63 y el lazo 134-139

tuvo que reposicionarse para ajustar a la cavidad interna en forma de Y predicha en el modelo. Asimismo, la densidad observada en la interfaz entre los dos monómeros de VP4, y que constituyen una lámina β , fue modelada a partir del extremo amino terminal de la proteasa de BSNV, ya que esta contiene una cadena β con una mayor homología de secuencia.

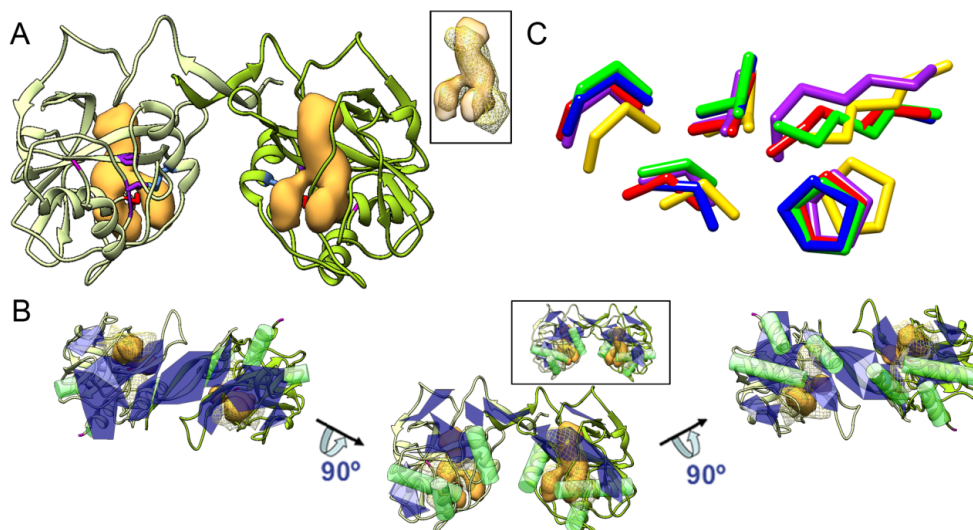


Figura 32. Ajuste flexible del modelo pseudo-atómico de la VP4 de IBDV. (A) Ajuste del modelo pseudo-atómico del dímero de VP4 sobre la SSE del dímero de VP4 generada a partir del mapa de crio-ME. En el inserto se muestra el ajuste hecho a la cavidad en forma de Y, predicha a partir del mapa de crio-ME (B) Superposición del modelo pseudo-atómico del dímero de VP4 con la SSE generada a partir del mapa de densidad, en el recuadro se muestra otra vista del modelo inclinada 35° (C) Superposición de los residuos del sitio activo de las proteasas de birnavirus luego del ajuste realizado para IBDV. BSNV rojo, IPNV azul, TV1 amarillo YAV verde e IBDV morado.

A partir del modelo pseudo-atómico de VP4 se generó la estructura helicoidal correspondiente (Figura 33A y B) y se calculó un mapa de diferencia con respecto al mapa de crio-ME anteriormente descrito (Figura 33C-E). Al analizar dicho mapa de diferencia se advierte que el modelo pseudo-atómico se ajusta bastante bien, dejando sólo sin identificar 8 residuos amino terminal y 30 carboxilo terminal que inicialmente no estaban representados en el modelo pseudo-atómico.

4.2.6 Interacciones proteicas que estabilizan los tubos de VP4

Al analizar las interacciones existentes entre las moléculas de VP4 que conforman el tubo, se encuentran tres tipos: amino terminal, carboxilo terminal y laterales. Las interacciones amino terminal son las encargadas de generar el dímero de VP4 (dímero tipo I) (Figura 34) y están a cargo de dos cadenas β ubicadas en los extremos amino de cada subunidad de VP4, quedando ambas subunidades enfrentadas y giradas entre sí 135° y los centros activos hacia lados contrarios.

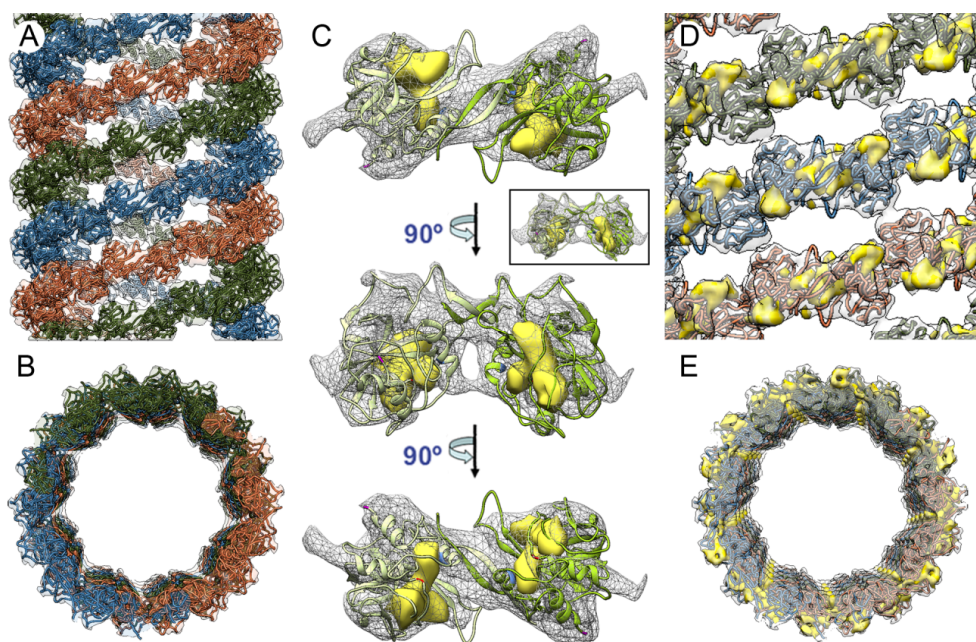


Figura 33. Acoplamiento de la estructura de VP4 de IBDV en la reconstrucción helicoidal. (A y B) Vista perpendicular y a lo largo del eje azimutal de la 3DR del tubo de VP4 construido a partir de del modelo pseudo-atómico de VP4 ajustado al mapa de crio-ME (C) Ajuste del dímero de VP4 sobre el dímero segmentado del mapa de crio-ME (D y E) Vista perpendicular y a lo largo del eje azimutal del mapa de diferencia del tubo de VP4.

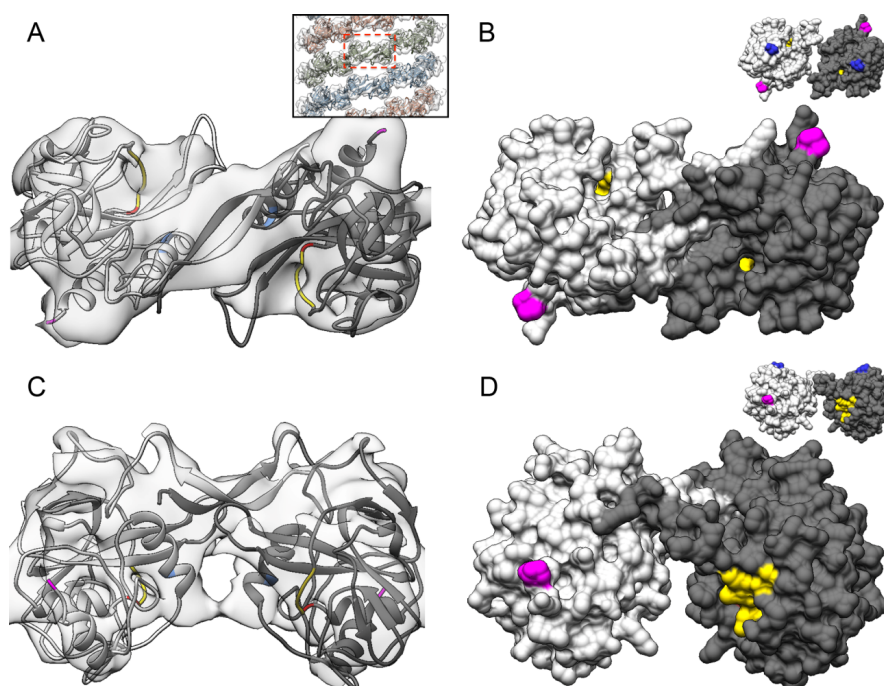


Figura 34. Interacciones del amino terminal de VP4. (A y C) Vistas exterior y lateral del modelo pseudo-atómico de VP4 ajustado en el dímero del mapa de crio-ME (B) Vistas exterior y lateral del modelo del mapa de superficie del dímero de VP4. El inserto señala la zona del dímero de VP4 a analizar en el tubo. En azul y rosado se indican los últimos residuos amino y carboxilo terminal modelados respectivamente y en amarillo el sitio activo.

Otro tipo de interacción registrado en el modelo 3DR del tubo de VP4 es entre dímeros de distintas hélices iniciales (dímero tipo III) (Figura 35), donde la región cercana a la hélice $\alpha 3$ de una subunidad interacciona con su equivalente en otra subunidad que se encuentra en la hélice inicial localizada justo por encima de ella.

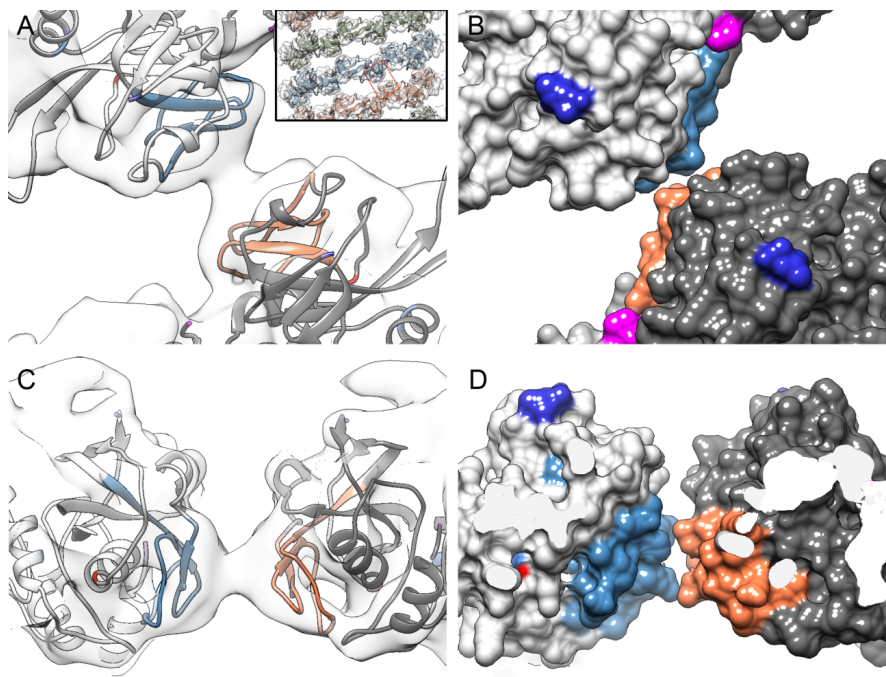


Figura 35. Interacciones interdiméricas. (A y C) Detalle de las vistas exterior y lateral del modelo pseudo-atómico de VP4 ajustado en el mapa de crio-ME (B) Vistas exterior y lateral del modelo del mapa de superficie de las subunidades que conforman el dímero de VP4. El inserto señala la zona del dímero de VP4 a analizar en el tubo. En azul oscuro y rosado se indican los últimos residuos amino y carboxilo terminal modelados respectivamente y en azul claro y naranja la región carboxilo terminal de cada monómero que interaccionan entre sí.

4.2.7 Cambios conformacionales que bloquean el sitio activo de VP4

Estudiando la superficie de los cuatro modelos atómicos de proteasas de birnavirus y el modelo pseudo-atómico generado por nosotros (Figura 36) se aprecia claramente que en el modelo de IBDV la cavidad o hendidura donde se procesa la poliproteína está parcialmente bloqueada, dejando totalmente inaccesible el sitio activo. Las interacciones entre los extremos carboxilo terminal, de las subunidades que conforman al dímero de VP4 en la estructura helicoidal, inducen una serie de cambios conformacionales que desplazan al lazo que precede a la hélice $\alpha 3$, donde se encuentra la lisina del sitio activo, bloqueando la cavidad o hendidura que contiene el sitio activo de la VP4 (Figura 37). Asimismo, esta interacción es la encargada de la polimerización de la VP4 y permite su ensamblaje en una estructura helicoidal.

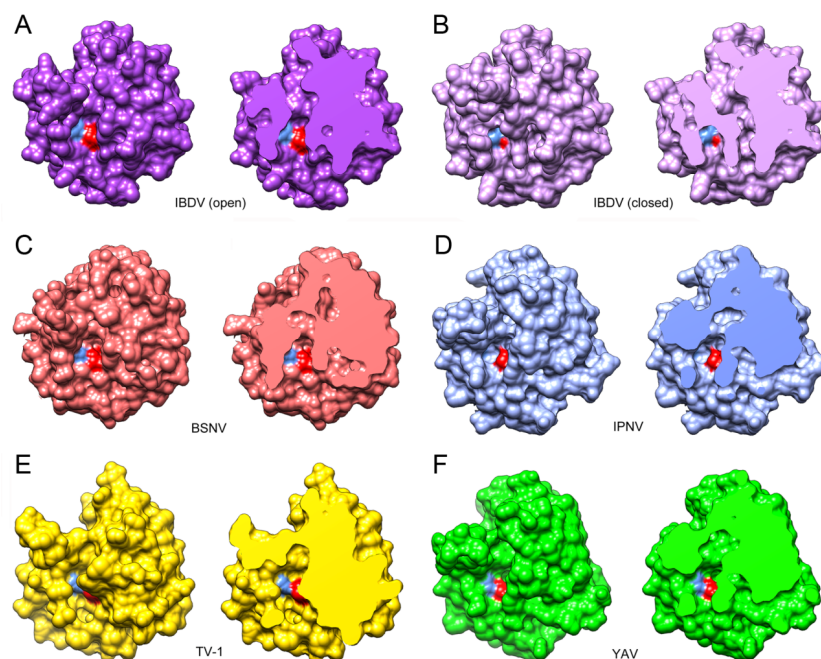


Figura 36. Mapas de superficie de los monómeros de VP4. (A) Mapa de superficie de un monómero de VP4 predicho a partir del núcleo común de las 4 estructuras de VP4 conocidas con el extremo amino terminal ajustado al de BSNV. (B) Mapa de superficie del monómero de VP4 que se obtiene al ajustar con el mapa de densidad (C, D, E y F) Mapa de superficie de los monómeros d VP4 de BSNV (rosa) IPNV (azul) TV-1 (amarillo) y YAV (verde) respectivamente. En todos los casos a la izquierda se muestra el monómero de VP4 y a la derecha un corte longitudinal del mismo que muestra el canal donde se localiza el sitio activo. En azul se indican la Ser y en rojo la Lys del sitio activo de cada molécula.

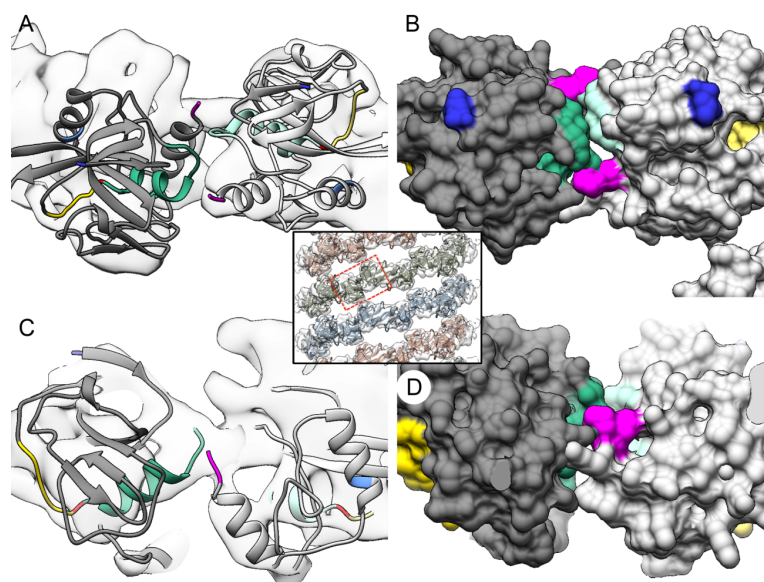


Figura 37. Interacciones del carboxilo terminal de VP4 que conforman el dímero e inactivan a la proteasa. (A y C) Vistas exterior y lateral del modelo pseudo-atómico de VP4 ajustado en dos subunidades que conforman dos dímeros en el mapa de crio-ME. En verde se indica la hélice α que es desplazada por el carboxilo terminal (rosa) de la subunidad vecina (B) Vistas exterior y lateral del modelo del mapa de superficie de las subunidades en el dímero de VP4. El inserto señala la zona del dímero de VP4 a analizar en el tubo. En azul y rosado se indican los últimos residuos amino y carboxilo terminal modelados respectivamente, en amarillo el sitio activo y en verde oscuro y claro las regiones carboxilo terminal de cada subunidad que están interaccionando.

5. Discusión

Los estudios presentados en este trabajo demuestran la capacidad que posee IBDV de ensamblar una procápsida a partir de intermediarios proteicos poco o nada procesados, como ha sido descrito para otros birnavirus. El conocimiento del proceso de maduración de la proteína de la cápsida ha permitido establecer los puntos claves e irreversibles en el ensamblaje. Este estudio plantea una alternativa que no había sido contemplada anteriormente, donde no solo los residuos involucrados en el enlace peptídico a ser procesado, o los involucrados en la actividad proteolítica, influyen en la actividad de la proteasa viral. Hemos demostrado que el entorno de dichos enlaces es también importante para el correcto procesamiento de la poliproteína; además, el orden de dicho procesamiento es un punto de inflexión para el ensamblaje y maduración de la cápsida. Asimismo, se han caracterizado estructuralmente los tubos formados por la proteasa viral. Se encuentran constituidos por dímeros de VP4 que interaccionan por sus extremos amino y carboxilo terminal, generando una estructura donde los sitios activos se hallan inactivados debido a cambios conformacionales en la estructura, que bloquean el canal donde se debe posicionar la poliproteína para ser procesada. Debido a esto, el ensamblaje de la proteasa en estructuras helicoidales parece tener una función regulatoria de su actividad proteolítica.

5.1 Ensamblaje de la procápsida de IBDV

La generación de nuevas partículas virales es un proceso dinámico y complejo en el que intervienen factores tanto virales como celulares. Los primeros pasos de una infección generalmente van dirigidos al ensamblaje de una procápsida, que posteriormente sufre una serie de transformaciones que dan origen a la partícula infectiva (Domitrovic *et al.*, 2013). Durante los últimos años en nuestro grupo hemos estado interesados en caracterizar los ensamblados macromoleculares que se producen durante infecciones con el virus de la bursitis infecciosa, enfocándonos principalmente en la cápsida de ~70 nm de diámetro, constituida por la proteína VP2 que encierra al material genético en forma de RNPs (Castón *et al.*, 2001; Irigoyen *et al.*, 2012; Irigoyen *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2009a; Luque *et al.*, 2009b; Saugar *et al.*, 2010).

La expresión de la poliproteína de IBDV en sistemas heterólogos de expresión da lugar a ensamblados icosaédricos y helicoidales (Castón *et al.*, 2008; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000). Con el sistema de baculovirus recombinantes, empleando el vector pFastBac, se ensamblan únicamente estructuras tubulares rígidas constituidas por pVP2, mientras que si se emplea el vector AcYM1 se obtienen tubos flexibles, con caperuza icosaédrica en los extremos, y VLPs. El análisis bioquímico realizado en este trabajo demostró que los tubos rígidos inicialmente están constituidos por pVP2 y VP3 pero esta última se pierde durante el paso por el colchón de sacarosa. Por otro lado también se demostró, por identificación con anticuerpos específicos y análisis de masas, que los tubos flexibles y las VLPs están formados por la

poliproteína entera, el precursor de la proteína de la cápsida (pVP2) y el intermediario VP4-VP3, con relaciones molares que varían dependiendo de si están ensamblados en forma de tubos (4:4:2) o VLPs (3:5:2). La presencia de estos intermediarios proteicos poco o nada procesados, es indicativo de un mal funcionamiento por parte de la proteasa viral, puesto que es incapaz de generar VP4 y VP3 libre, además de procesar al carboxilo terminal de pVP2.

Con la fracción enriquecida por VLPs se seleccionaron las partículas las más icosaédricas para realizar una reconstrucción tridimensional a 25.0 Å de resolución, y se determinó que dichas VLPs poseen una pared de mayor grosor cuando se comparan con las VLPs purificadas a partir de rVV vT7/LacOI/Poly. Asimismo, se detectaron unas prolongaciones hacia el interior de la cápsida las cuales se localizan en la base de los trímeros de VP2 y que corresponden a las interacciones del carboxilo terminal de VP2 con la proteína de fusión VP4-VP3 unida, bien covalentemente a VP4 en forma de poliproteína, o por interacciones electrostáticas con el extremo carboxilo terminal de VP3; otra posibilidad es que la proteína de fusión interaccione con la poliproteína ensamblada formando dímeros de VP3 o VP4 (Feldman *et al.*, 2006; Garriga *et al.*, 2006; Saugar *et al.*, 2010).

La cápsida T=13 de IBDV está constituida por 260 trímeros de VP2 que forman 12 pentámeros y 120 hexámeros (Böttcher *et al.*, 1997; Castón *et al.*, 2001; Coulibaly *et al.*, 2005) Mientras que los trímeros de VP2 pentaméricos tienen contactos inclinados entre ellos (ángulo diedro ~144°), los trímeros hexaméricos forman contactos planos (ángulo diedro ~180°), con el dominio P orientado de forma ortogonal a la superficie externa de la cápsida (Figura 38). A pesar de estas diferencias en los contactos entre los trímeros pentaméricos y hexaméricos (Luque *et al.*, 2007), los extremos amino terminales de las moléculas de VP2 se encuentran próximos en los centros de las caras internas de los pentámeros y hexámeros, por lo que la presencia de VP4-VP3, unida o no covalentemente, puede resultar en impedimentos estéricos que impidan el ensamblaje de los pentámeros y hexámeros. En el caso de estructuras tubulares, la proporción de pVP2 frente a los otros dos componentes es menor, por lo que probablemente la formación de hexámeros se ve favorecida, mientras que en las VLPs al haber mas pVP2 la limitación estérica debe ser mucho menor y el ensamblaje de cápsidas T=13 es más eficiente, debido a la posibilidad de formar un mayor número de pentámeros; además, la capacidad de la cápsida de IBDV de ensamblar proteínas en además de VP2 de forma eficiente ha sido demostrada anteriormente (Pascual, 2013).

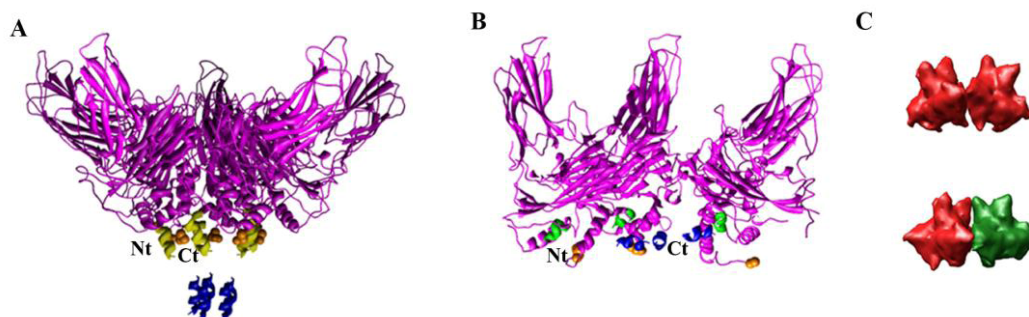


Figura 38. Curvatura de los pentámeros y hexámeros en la cápsida viral. (A) Estructura atómica de un vértice pentamérico de la cápsida de IBDV. En morado se muestran los trímeros de VP2, en amarillo se destacan las hélices amino terminales, en naranja el último residuo carboxilo terminal resuelto en la estructura cristalográfica y en azul la posición de las hélices $\alpha 5$ anfipáticas de acuerdo con la estructura obtenida por microscopía electrónica (Luque *et al.*, 2007). (B) Sección de un hexámero de la cápsida de IBDV donde se observa la distribución planar de los trímeros que lo componen. El código de color es el mismo que en (A), salvo que las hélices amino terminales están marcadas en verde. (C) Representación de superficie de los contactos entre dos trímeros pentaméricos adyacentes (rojo) y un trímero pentamérico con uno hexamérico (rojo, verde).

Estos resultados plantean que IBDV es capaz de ensamblarse a partir de intermediarios proteicos poco o nada procesados de la poliproteína viral, como ha sido reportado para otros virus tales como herpesvirus (Chi y Wilson, 2000), HIV (Ganser-Pornillos *et al.*, 2012) o IPNV (Villanueva *et al.*, 2004). La procápsida de IPNV, un birnavirus acuático, se obtiene durante las primeras horas de infección y posee un diámetro ligeramente superior al de la cápsida madura. Además, está constituida por polipéptidos maduros e inmaduros que con el paso de las horas evolucionan a una forma infectiva con sus componentes totalmente procesados (Villanueva *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, sería muy probable que en infecciones naturales de IBDV se genere una estructura similar a las procápsidas obtenidas en este trabajo, lo que introduce una alternativa en el proceso de ensamblaje distinta al modelo propuesto actualmente, donde se contempla la interacción y ensamblaje a partir de las proteínas pVP2 y VP3 una vez escindidas de la poliproteína (Irigoyen *et al.*, 2012).

Debido a la presencia de los intermediarios proteicos poco o nada procesados, se planteó que la actividad de la proteasa viral podría estar comprometida en el sistema de baculovirus empleado. Por ello se co-infectaron células de insecto con los baculovirus AcYM1-Poly y FB-HTVP4 buscando proporcionar una fuente extra de VP4 que procesara a los intermediarios proteicos ensamblados en las procápsidas, y consiguiera finalmente su maduración. Sólo fue posible obtener estructuras tubulares similares a las obtenidas en infecciones con FB-Poly, por lo que este resultado, además de corroborar la actividad en *trans* de la proteasa de IBDV (Birghan *et al.*, 2000; Sanchez y Rodriguez, 1999), sugiere que el procesamiento llevado a cabo por la VP4 extra tiene lugar inmediatamente después de la expresión de la poliproteína. Esto queda confirmado al analizar por WB dicha co-infección, puesto que la cantidad de de pVP2, VP3 y

VP4 libre aumenta en comparación con la obtenida en infecciones en células de insecto donde sólo hay AcYM1-Poly, y al mutar el sitio activo de FB-HTVP4, el efecto se revierte descartando también cualquier efecto que pueda tener el fondo del baculovirus empleado.

Como ninguno de los resultados obtenidos hasta el momento consigue aclarar por qué la proteasa viral no está funcionando correctamente, se decidió analizar las secuencias de ambos baculovirus y compararlas con la cepa de IBDV de la cual se generaron originalmente, sólo se hallaron cuatro cambios puntuales: dos en el extremo carboxilo terminal de pVP2 (A485D y R505H) y dos en VP3 (V888L y K894T). Los cambios en VP3 son comunes para ambos baculovirus, pero sólo en AcYM1-Poly se sustituye la Arg 505 por una His, por lo que se decidió construir el FB-Poly-R505H y ver si con este recombinante es posible ensamblar procápsidas. Al comparar dicha infección con infecciones de IBDV, FB-Poly y AcYM1-Poly obtenemos patrones totalmente distintos; por IF detectamos algunas estructuras tubulares constituidas por VP4 y VP2 pero el patrón mayoritario observado para VP2 y VP3 es más parecido al obtenido en infecciones con IBDV; y al purificar efectivamente recuperamos, además de estructuras tubulares, VLPs icosaédricas que recuerdan a los viriones maduros. Nuestros resultados sugieren que la mutación A485D en el extremo carboxilo terminal de pVP2 altera su capacidad para ser procesada y ensamblada en cápsidas, mientras que la mutación R505H compensa dicha mutación y permite recuperar la capacidad de ensamblar VLPs aunque de manera menos eficiente a la que tenía la poliproteína original cuando es expresada en el sistema vaccinia recombinante (Fernandez-Arias *et al.*, 1998).

El orden en el procesamiento de una poliproteína es un factor importante y determinante para el correcto ensamblaje de partículas virales, tal como se ha demostrado para poliovirus (Wang *et al.*, 2012), el virus Semliki Forest (Lulla *et al.*, 2013), virus dengue (Li *et al.*, 2008) y HIV entre otros, ya que las formas maduras e inmaduras de una proteína pueden tener funciones diferentes (Yeager, 2011). Nuestros resultados sugieren las mutaciones A485D y R505H en el extremo carboxilo terminal de pVP2 afectan la actividad de VP4, aun cuando no se traten de los residuos del enlace peptídico a ser procesado. Probablemente la cercanía de dichas mutaciones con los sitios de procesamiento, ubicados en las posiciones Ala487-Ala488, Ala494-Ala495, Ala501-Ala502 y Ala512-Ala513, bloquee o impida la actividad proteolítica. Además, parece haber un orden preferencial para dicho procesamiento, donde primero debe llevarse a cabo la ruptura del enlace pVP2-VP4 para luego poder procesar el enlace VP4-VP3. Esto se evidencia en los resultados derivados de los análisis bioquímicos, donde no se detectaron intermediarios pVP2-VP4 y muy poca cantidad de VP3 y VP4 libre.

El HIV inicialmente se ensambla a partir de una poliproteína constituida por tres dominios: matriz (MA), cápsida (CA) y nucleocápsida (NC), que participan en la formación de un virión inmaduro y en la selección del RNA a ser empaquetado. El procesamiento de dicho precursor induce a que la proteína madura CA se organice en estructuras parecidas a conos que finalmente originaran al virus. La diferencia estructural entre la procápsida y el virus maduro ha sido estudiada extensamente, demostrando que los extremos amino terminales de CA pasan de un estado desordenado a uno ordenado, generando una estructura en forma de horquilla luego de su liberación de la poliproteína. Asimismo, se han detectado residuos dentro de la horquilla que han demostrado prevenir el ensamblaje adecuado de la cápsida, generando partículas no infectivas (Ganser-Pornillos *et al.*, 2012; Yost y Marcotrigiano, 2013); por lo que el efecto que pueden tener ciertos residuos que no están involucrados directamente en el procesamiento de los precursores de las cápsidas es un efecto observado en otros sistemas.

5.2 Estructura de la proteasa viral de IBDV

La asociación de proteínas para formar dímeros y oligómeros es un fenómeno bastante común, que de acuerdo a estudios estructurales y biofísicos, es también un factor primordial en la regulación de proteínas como enzimas, canales de iones, receptores y factores de transcripción (Jaffe y Lawrence, 2012; Lai y Linder, 2013; Salussolia *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013).

En este trabajo hemos demostrado que la proteasa de IBDV es capaz de autoensamblarse en estructuras helicoidales, idénticas a las obtenidas en infecciones naturales. Tubos de VP4 purificados a partir de bacterias recombinantes y dializados frente al tampón borato sódico fueron vitrificados y analizados mediante crio-ME, mostrando una población de filamentos de aspecto relativamente rígido, con un diámetro homogéneo de ~25 nm y una longitud variable desde ~100 nm hasta ~1 µm. La comparación entre el patrón de difracción de dichos filamentos con el obtenido simultáneamente a partir del fago T4 mostró que VP4 es una hélice dextrógira formada por tres hebras relacionadas por simetría C3 alrededor del eje azimutal de la hélice que poseen una elevación axial igual a 18.4 Å y un ángulo de rotación de 40.6°. A partir de 609 imágenes se generó un mapa 3D de 8.8 Å de resolución, demostrando que el tubo de VP4 es un cilindro hueco que posee un diámetro externo de 246 Å y un diámetro interno de 122 Å formado por tres hebras que dejan numerosos poros entre sí.

La proteasa de los birnavirus es una serín proteasa que se encuentra ampliamente estudiada, conociéndose hasta la fecha la estructura cristalográfica de cuatro de ellas: BSNV (Feldman *et al.*, 2006), IPNV (Lee *et al.*, 2007), TV-1 (Chung y Paetzel, 2011) y YAV (Chung y Paetzel, 2013). En todas a pesar de la poca homología de sus secuencias, su estructura se encuentra

altamente conservada y está constituida por tres hélices α y entre 14 y 16 láminas β . Asimismo, se ha reportado la existencia de un canal en su superficie que contiene todos los residuos catalíticos y donde se posiciona la poliproteína al momento de ser procesada.

El modelo pseudo-atómico de la VP4 de IBDV generado en este estudio, se obtuvo usando como molde a las cuatro estructuras de proteínas de birnavirus descritas hasta la fecha seguido de un ajuste flexible. La estructura generada fue acoplada al mapa de crio-ME demostrando que la unidad básica formadora es el dímero, pudiéndose diferenciar tres tipos: dímero tipo I, el cual se obtiene gracias a las interacciones amino terminales entre VP4 de la misma hebra; dímero tipo II, generado por interacciones entre los extremos carboxilo terminal entre proteínas ubicadas también en la misma hebra; y por último el dímero tipo III, que se forma por la interacción entre las regiones amino terminales de VP4 ubicadas en hebras adyacentes. El dímero tipo I es la forma natural de VP4, puesto que es bastante estable y ya ha sido reportado anteriormente para la VP4 de BSNV (Feldman *et al.*, 2006). Los otros dos tipos de dímeros se generan por el ensamblaje del dímero tipo I en la estructura tubular, siendo ambos los responsables de la polimerización y estabilización de la estructura helicoidal.

La predicción de estructura secundaria, obtenida a partir del dímero de VP4 segmentado del mapa de crio-ME, predice tres hélices α y 7 láminas β para cada monómero, que al ser acopladas con el modelo pseudoatómico, y luego de un ajuste flexible, encajan perfectamente. Para dicho ajuste no se alteraron las posiciones de los residuos catalíticos, además se ajustaron las tres hélices α predichas y se movió el lazo localizado entre la hélice α_3 y la lamina β_{14} . Asimismo, los extremos amino terminales fueron modelados a partir de sus homólogos en la estructura de BSNV (Feldman *et al.*, 2006), quedando dispuestos hacia la parte superior del dímero y no hacia un lateral como en BSNV. Luego de todos los ajustes ambos monómeros quedan desplazados entre si un ángulo de 135° , posicionando ambos sitios activos hacia caras contrarias en el tubo.

Las Lon proteasas bacterianas son proteínas que se caracterizan por poseer un dominio amino terminal con actividad ATPasa y un dominio carboxilo terminal con actividad proteasa que guarda una alta homología con el extremo carboxilo terminal de la proteasa de IBDV (Birghan *et al.*, 2000; Botos *et al.*, 2004). Se ha reportado que estas proteasas se ensamblan en anillos hexaméricos mediante la interacción de sus dominios proteasa, dejando los sitios catalíticos localizados en una concavidad poco profunda en la superficie. Dicha concavidad o cámara se encuentra opuesta a los dominios amino terminal que forman un anillo por donde pasa el sustrato que posteriormente es degradado en la cámara proteolítica (Botos *et al.*, 2004; Kress y

Weber-Ban, 2009; Park *et al.*, 2006). Al comparar con los resultados obtenidos en este estudio, podemos deducir que la capacidad de oligomerizar de VP4 deriva de estas proteasas bacterianas, al igual que la cavidad para el procesamiento del sustrato, aunque en el caso de las Lon proteasas ésta se forma luego de la oligomerización, indicando que la formación del anillo hexamérico es necesario para la actividad de la proteína.

En el modelo tridimensional del tubo de VP4, la proteasa se encuentra inactiva, ya que la cavidad donde se localizan los residuos catalíticos está bloqueada por el lazo ubicado entre la hélice $\alpha 3$ y la lamina $\beta 14$, siendo la interacción entre los extremos carboxilos terminales de los dímeros tipo II la responsable de éste bloqueo. Recientemente se ha reportado que las Lon proteasas son también capaces de asociarse en estructuras más complejas, específicamente dodecámeros con una forma alargada donde las cámaras proteolíticas se encuentran en posiciones opuestas y separadas por una matriz constituida por la interacción de sus extremos amino terminales. Estas interacciones generan portales de $\sim 45 \text{ \AA}$ que proporcionan acceso al lumen de la enzima además, en comparación con las estructuras hexaméricas, los dodecámeros son mucho menos activos en la degradación de sustratos de gran tamaño pero iguales en la degradación de sustratos pequeños, lo que garantiza un mecanismo para la regulación de su actividad proteolítica (Vieux *et al.*, 2013).

Otro claro ejemplo de activación de una proteína por oligomerización es el complejo proteico tricornio, el cual forma parte del proteosoma. Está constituido por múltiples copias de una proteína de 120 kDa que se asocian en homohexámeros. Dichos homohexámeros están constituidos a su vez por dos anillos triméricos que interaccionan entre sí a través de los sitios catalíticos, formando una estructura toroide que finalmente interacciona con otros homohexámeros y se ensambla en un complejo similar a una cápsida icosaédrica. La estructura cristalográfica del homohexámero del tricornio demuestra que cada monómero está constituido a su vez por cinco dominios bien definidos, con funciones definidas y coordinadas en el procesamiento del sustrato, creando un canal de procesamiento en el centro del homohexámero por donde entra el sustrato (Groll *et al.*, 2005; Walz *et al.*, 1997)

Los estudios presentados en este trabajo indican que la proteasa de IBDV posee un mecanismo de regulación que consiste en su ensamblaje en estructuras tubulares que originan su inactivación. De esta manera probablemente se evite o minimice la activación de señales celulares durante la infección. Igualmente, la proteasa de IBDV parece ser la única proteasa de birnavirus capaz de formar estas estructuras, lo que muy probablemente se deba al tipo de interacciones presentes entre las subunidades. Como se ha demostrado, la unidad formadora del tubo es el dímero formado por la interacción de los extremos amino terminales, el cual no es

exactamente igual al dímero de BSNV descrito (Feldman *et al.*, 2006), puesto que los monómeros que lo constituyen son una imagen especular con sus extremos amino terminales dispuestos hacia la parte delantera del dímero, y los sitios activos dan hacia la misma cara, por lo que sería imposible obtener una estructura helicoidal similar a la de IBDV. Para el caso de las otras tres estructuras no se obtuvieron dímeros, pero no es de extrañar puesto que fueron generadas a partir de formas proteínas con los extremos amino y carboxilo terminales delecionados.

6. Conclusiones

1. La cápsida T=13 de IBDV se forma a partir de una procápsida de morfología esférica, que probablemente constituye una partícula precursora inocua, constituida por precursores proteicos que pueden incluir la poliproteína completa, la forma inmadura de la proteína de la cápsida, pVP2, y la proteína de fusión VP4-VP3.
2. La actividad de la proteasa VP4 está fuertemente bloqueada por la sustitución R505H, próxima a los sitios de procesamiento de VP4 localizados en la región carboxilo terminal de pVP2 (Ala501-Ala502 y Ala512-Ala513), indicando que el contexto de los sitios de procesamiento determina la actividad de VP4.
3. La proteasa VP4 se encuentra mayoritariamente en las células infectadas por IBDV como ensamblados tubulares cuya estructura ha sido resuelta a ~ 8 Å de resolución a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. Los ensamblados de VP4 tienen simetría helicoidal, con una elevación axial de 18.4 Å y ángulo de rotación igual a 40.6°, y están constituidos por tres hebras fundamentales dextrógiras. El bloque estructural básico es un dímero de VP4.
4. El modelo pseudo-atómico de la VP4 de IBDV, generado mediante modelado de homología y técnicas de ajuste flexible, indica que el extremo amino terminal participa en las interacciones intradiméricas, mientras que integridad de la hélice está mediada por interacciones interdiméricas entre la región del extremo carboxilo terminal de VP4 de dímeros adyacentes de la misma hebra, y la región amino terminal de VP4 de dímeros de hebras adyacentes.
5. La hendidura superficial de VP4 donde se localiza la diada catalítica Ser/Lys y el sitio de unión al sustrato (el péptido comprendido entre las proteínas estructurales de la poliproteína de IBDV), tiene bloqueado su acceso en los ensamblados helicoidales; este cambio conformacional está inducido por los contactos interdiméricos mediados por la región del extremo carboxilo terminal de VP4. Por tanto, los tubos helicoidales de VP4 constituyen una forma de inactivación de su actividad proteasa, evitando posibles alteraciones de los componentes virales y/o del huésped, necesarios para una multiplicación efectiva del virus.

7. Bibliografía

- Abrescia, N. G., Bamford, D. H., Grimes, J. M. y Stuart, D. I. (2012). Structure unifies the viral universe. *Annu Rev Biochem*, 81, 795-822.
- Adamczak, R., Porollo, A. y Meller, J. (2005). Combining prediction of secondary structure and solvent accessibility in proteins. *Proteins*, 59(3), 467-475.
- Adamson, C. S. (2012). Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Mol Biol Int*, 2012, 604261.
- Ang, D., Keppel, F., Klein, G., Richardson, A. y Georgopoulos, C. (2000). Genetic analysis of bacteriophage-encoded cochaperonins. *Annu Rev Genet*, 34, 439-456.
- Antin, P. B. y Ordahl, C. P. (1991). Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol*, 143(1), 111-121.
- Baker, M. L., Abeyasinghe, S. S., Schuh, S., Coleman, R. A., Abrams, A., Marsh, M. P., Hryc, C. F., Ruths, T., Chiu, W. y Ju, T. (2011). Modeling protein structure at near atomic resolutions with Gorgon. *J Struct Biol*, 174(2), 360-373.
- Baker, M. L., Ju, T. y Chiu, W. (2007). Identification of secondary structure elements in intermediate-resolution density maps. *Structure*, 15(1), 7-19.
- Baker, T. S., Olson, N. H. y Fuller, S. D. (1999). Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron Micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(4), 862-922.
- Bamford, D. H., Grimes, J. M. y Stuart, D. I. (2005). What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol*, 15(6), 655-663.
- Birghan, C., Mundt, E. y Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.*, 19(1), 114-123.
- Black, L. W. y Rao, V. B. (2012). Structure, assembly, and DNA packaging of the bacteriophage T4 head. *Adv Virus Res*, 82, 119-153.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropea, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A. y Gustchina, A. (2004). The catalytic domain of Escherichia coli Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J Biol Chem*, 279(9), 8140-8148.
- Bottcher-Friebertshauser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlenendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H. D. y Garten, W. (2010). Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol*, 84(11), 5605-5614.

- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. y Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.*, 71(1), 325-330.
- Brancato, V., Peduto, A., Wharton, S., Martin, S., More, V., Di Mola, A., Massa, A., Perfetto, B., Donnarumma, G., Schiraldi, C., Tufano, M. A., de Rosa, M., Filosa, R. y Hay, A. (2013). Design of inhibitors of influenza virus membrane fusion: Synthesis, structure-activity relationship and in vitro antiviral activity of a novel indole series. *Antiviral Res.*, 99(2), 125-135.
- Brockman, W. W. y Nathans, D. (1974). The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(3), 942-946.
- Bublot, M., Pritchard, N., Le Gros, F. X. y Goutebroze, S. (2007). Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J Comp Pathol*, 137 Suppl 1, S81-84.
- Busnadiego, I., Maestre, A. M., Rodriguez, D. y Rodriguez, J. F. (2012). The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7(10), e46768.
- Cann, A. J. (2012). *Principles of Molecular Virology*: Elsevier, Amsterdam.
- Cardone, G., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. y Steven, A. C. (2012). Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. *Adv Exp Med Biol*, 726, 423-439.
- Cardone, G., Purdy, J. G., Cheng, N., Craven, R. C. y Steven, A. C. (2009). Visualization of a missing link in retrovirus capsid assembly. *Nature*, 457(7230), 694-698.
- Casañas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., Gonzalez, D., Rodriguez, J. F. y Verdaguer, N. (2008). Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure*, 16(1), 29-37.
- Caspar, D. L. y Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, 1-24.
- Castón, J. y Carrascosa, J. (2013). The basic architecture of viruses. In *Structure and Physics of Viruses* (ed. M. G. Mateu), pp. 718: vol. in press. The Netherlands.
- Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. y Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.*, 75(22), 10815-10828.
- Castón, J. R., Rodríguez, J. F. y Carrascosa, J. L. (2008). Infectious Bursal Disease Virus: A Segmented Double-Stranded RNA Virus With a T = 13 Capsid that Lacks a T = 1 Core. In *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*: Academic Press.

- Cole, C., Barber, J. D. y Barton, G. J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W197-201.
- Conway, J. F., Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C. y Steven, A. C. (1993). The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J Struct Biol*, 111(3), 222-233.
- Cosgrove, A. S. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, 6(3), 385-389.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. y Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120(6), 761-772.
- Crowther, R. A., Amos, L. A., Finch, J. T., De Rosier, D. J. y Klug, A. (1970). Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs. *Nature*, 226(5244), 421-425.
- Chang, H. C., Lin, T. L. y Wu, C. C. (2003). DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine*, 21(5-6), 507-513.
- Chang, J. R., Poliakov, A., Prevelige, P. E., Mobley, J. A. y Dokland, T. (2008). Incorporation of scaffolding protein gpO in bacteriophages P2 and P4. *Virology*, 370(2), 352-361.
- Cheng, J., Randall, A. Z., Sweredoski, M. J. y Baldi, P. (2005). SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W72-76.
- Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J. y Delmas, B. (2005). Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol*, 79(19), 12253-12263.
- Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B. y Delmas, B. (2004). The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 78(7), 3296-3303.
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. y Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.*, 76(5), 2384-2392.
- Chi, J. H. y Wilson, D. W. (2000). ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J Virol*, 74(3), 1468-1476.
- Choi, M. H., Lee, C. K. y Kim, H. D. (2010). Design and synthesis of 3'-fluoropenciclovir analogues as antiviral agents. *Arch Pharm Res*, 33(2), 197-202.
- Chow, M., Basavappa, R. y Hogle, J. M. (1997). The role of conformational transitions in poliovirus pathogenesis. In *Structural biology of viruses*, pp. 157-186 Oxford University Press.

- Chung, I. Y. y Paetzel, M. (2011). Crystal structure of a viral protease intramolecular acyl-enzyme complex: insights into cis-cleavage at the VP4/VP3 junction of Tellina birnavirus. *J Biol Chem*, 286(14), 12475-12482.
- Chung, I. Y. y Paetzel, M. (2013). Crystal structures of Yellowtail ascites virus VP4 protease: trapping an internal cleavage site trans acyl-enzyme complex in a native Ser/Lys dyad active site. *J Biol Chem*.
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. y Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.*, 76(5), 2393-2402.
- Delmas, B., Mundt, E., Vakharia, V. N. y Wu, J. L. (2012). The Double Stranded RNA Viruses. In *Virus Taxonomy. Family Birnaviridae*, pp. 499-507 Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Dobos, P. (1993). In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology*, 193(1), 403-413.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. y Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol*, 32(2), 593-605.
- Dokland, T. (2000). Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Structure*, 8(8), R157-162.
- Domitrovic, T., Movahed, N., Bothner, B., Matsui, T., Wang, Q., Doerschuk, P. C. y Johnson, J. E. (2013). Virus assembly and maturation: auto-regulation through allosteric molecular switches. *J Mol Biol*, 425(9), 1488-1496.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowall, A. W. y Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 21(2), 129-228.
- Duda, R. L., Oh, B. y Hendrix, R. W. (2013). Functional Domains of the HK97 Capsid Maturation Protease and the Mechanisms of Protein Encapsidation. *J Mol Biol*, 425(15), 2765-2781.
- Dulbecco, R. y Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3), 396-397.
- Egelman, E. H. (2000). A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy*, 85(4), 225-234.
- Egelman, E. H. (2010). Reconstruction of helical filaments and tubes. *Methods Enzymol*, 482, 167-183.
- Ekici, O. D., Paetzel, M. y Dalbey, R. E. (2008). Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci*, 17(12), 2023-2037.

- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. y Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 4), 486-501.
- Escaffre, O., Le Nouen, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K. M., Guionie, O., Toquin, D., Muller, H., Islam, M. R. y Eterradossi, N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol*, 87(5), 2767-2780.
- Feldman, A. R., Lee, J., Delmas, B. y Paetzel, M. (2006). Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J. Mol. Biol.*, 358(5), 1378-1389.
- Fernandez-Arias, A., Risco, C., Martinez, S., Albar, J. P. y Rodriguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol*, 79 (Pt 5), 1047-1054.
- Fernandez, J. J., Luque, D., Caston, J. R. y Carrascosa, J. L. (2008). Sharpening high resolution information in single particle electron cryomicroscopy. *J Struct Biol*, 164(1), 170-175.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Rancaniello, V. R. y Skalka, A. M. (2009). *Principles of Virology*, Third edition. Washington, DC: ASM Press.
- Fodor, I., Horvath, E., Fodor, N., Nagy, E., Rencendorsh, A., Vakharia, V. N. y Dube, S. K. (1999). Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet Hung*, 47(4), 481-492.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. y Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, 116(1), 190-199.
- Fuller, S. D., Butcher, S. J., Cheng, R. H. y Baker, T. S. (1996). Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles--the uncommon line. *J Struct Biol*, 116(1), 48-55.
- Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. y Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem*, 282(28), 20774-20784.
- Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M. y Pornillos, O. (2012). Assembly and architecture of HIV. *Adv Exp Med Biol*, 726, 441-465.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J. F. y Verdaguer, N. (2007). Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20540-20545.
- Garriga, D., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. (2006). The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J Virol*, 80(14), 6895-6905.

- Gertsman, I., Gan, L., Guttman, M., Lee, K., Speir, J. A., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Komives, E. A. y Johnson, J. E. (2009). An unexpected twist in viral capsid maturation. *Nature*, 458(7238), 646-650.
- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Kollner, B. y Mundt, E. (1997). A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol*, 71(11), 8879-8885.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. y Huber, R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem*, 6(2), 222-256.
- Harrison, S. C. (2007). Principles of virus structure. In *Fields Virology*, vol. 1 eds. P. M. Knipe, D. E. G. Howley, R.A. , M. A. Lamb, B. Martin y S. E. Roizman), pp. 59-98. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hendrix, R. W. y Johnson, J. E. (2012). Bacteriophage HK97 capsid assembly and maturation. *Adv Exp Med Biol*, 726, 351-363.
- Heymann, J. B. y Belnap, D. M. (2007). Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol*, 157(1), 3-18.
- Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. y Everitt, E. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol*, 73(4), 3484-3490.
- Huang, L. y Chen, C. (2013). Understanding HIV-1 protease autoprocessing for novel therapeutic development. *Future Med Chem*, 5(11), 1215-1229.
- Irigoyen, N., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. (2012). Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem*, 287(29), 24473-24482.
- Irigoyen, N., Garriga, D., Navarro, A., Verdager, N., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009). Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem*, 284(12), 8064- 8072.
- Jaffe, E. K. y Lawrence, S. H. (2012). Allostery and the dynamic oligomerization of porphobilinogen synthase. *Arch Biochem Biophys*, 519(2), 144-153.
- Jain, N. K. y Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*, 18(1), 24-36.
- James, M. N. (2006). The peptidases from fungi and viruses. *Biol Chem*, 387(8), 1023-1029.
- Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M. L., Prevelige, P. E., Jr. y Chiu, W. (2003). Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol*, 10(2), 131-135.
- Johnson, J. E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), 27-33.

- Johnson, J. E. (2008). Multi-disciplinary studies of viruses: the role of structure in shaping the questions and answers. *J Struct Biol*, 163(3), 246-253.
- Johnson, J. E. y Chiu, W. (2007). DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr Opin Struct Biol*, 17(2), 237-243.
- Johnson, J. E. y Rueckert, R. R. (1997). Packaging and release of the viral genome. In *Structural Biology of Viruses* eds. R. M. Chiu y R. L. Burnett), pp. 269–287: University Press Oxford.
- Kaufer, I. y Weiss, E. (1980). Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun*, 27(2), 364-367.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988). Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 69 (Pt 8), 1757-1775.
- Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Leiman, P. G., Arisaka, F., Mesyanzhinov, V. V. y Rossmann, M. G. (2005). The tail structure of bacteriophage T4 and its mechanism of contraction. *Nat Struct Mol Biol*, 12(9), 810-813.
- Kress, W. y Weber-Ban, E. (2009). The alternating power stroke of a 6-cylinder AAA protease chaperone engine. *Mol Cell*, 35(5), 545-547.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, J. y Linder, M. E. (2013). Oligomerization of DHHC Protein S-Acyltransferases. *J Biol Chem*.
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. y Wang, A. H. (2006). Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity. *J. Struct. Biol.*, 155(1), 74-86.
- Lee, J., Feldman, A. R., Delmas, B. y Paetzel, M. (2007). Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *J Biol Chem*, 282(34), 24928-24937.
- Leidig, C., Bange, G., Kopp, J., Amlacher, S., Aravind, A., Wickles, S., Witte, G., Hurt, E., Beckmann, R. y Sinning, I. (2013). Structural characterization of a eukaryotic chaperone--the ribosome-associated complex. *Nat Struct Mol Biol*, 20(1), 23-28.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol*, 81(Pt 4), 983-992.
- Lepault, J. y Leonard, K. (1985). Three-dimensional structure of unstained, frozen-hydrated extended tails of bacteriophage T4. *J Mol Biol*, 182(3), 431-441.

- Li, L., Lok, S. M., Yu, I. M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J. y Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, 319(5871), 1830-1834.
- Li, Z., Wang, Y., Li, X., Li, X., Cao, H. y Zheng, S. J. (2013). Critical roles of glucocorticoid-induced leucine zipper in infectious bursal disease virus (IBDV)-induced suppression of type I Interferon expression and enhancement of IBDV growth in host cells via interaction with VP4. *J Virol*, 87(2), 1221-1231.
- Li, Z., Wang, Y., Xue, Y., Li, X., Cao, H. y Zheng, S. J. (2012). Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J Virol*, 86(3), 1328-1338.
- Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R. y Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2), 152-159.
- Liu, M. y Vakharia, V. N. (2006). Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol*, 80(7), 3369-3377.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. y Rodriguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol*, 73(8), 6973-6983.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A. y Rodriguez, J. F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 277(2), 345-357.
- Lu, G., Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X., Chen, S., Gu, X. y Chiu, W. (1998). Structure of double-shelled rice dwarf virus. *J Virol*, 72(11), 8541-8549.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. y Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 67(8), 4566-4579.
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. y Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, 128(1), 82-97.
- Lulla, V., Karo-Astover, L., Rausalu, K., Merits, A. y Lulla, A. (2013). Presentation overrides specificity: probing the plasticity of alphaviral proteolytic activity through mutational analysis. *J Virol*.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Castón, J. R. (2009a). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyphoid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2148-2152.
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Castón, J. R. (2009b). Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol*, 386(3), 891-901.

- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. y Caston, J. R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, 81(13), 6869-6878.
- Mahgoub, H. A., Bailey, M. y Kaiser, P. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*, 157(11), 2047-2057.
- Marabini, R., Masegosa, I. M., San Martin, M. C., Marco, S., Fernandez, J. J., de la Fraga, L. G., Vaquerizo, C. y Carazo, J. M. (1996). Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol*, 116(1), 237-240.
- Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J. F. y Lombardo, E. (2003a). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.*, 77(4), 2459-2468.
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F. y Rodríguez, J. F. (2003b). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.*, 77(11), 6438-6449.
- Martinez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology*, 278(2), 322-331.
- Martinez-Torrecuadrada, J. L., Saubi, N., Pages-Mante, A., Caston, J. R., Espuna, E. y Casal, J. I. (2003). Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine*, 21(23), 3342-3350.
- Mateo, R. (2004). Disección funcional de las interfases entre subunidades de la cápsida del virus de la fiebre aftosa y aproximaciones al diseño de cápsidas más estables., Universidad Autónoma de Madrid.
- Mateu, M. G. (2013). Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys*, 531(1-2), 65-79.
- Matsuura, Y., Possee, R. D., Overton, H. A. y Bishop, D. H. (1987). Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol*, 68 (Pt 5), 1233-1250.
- McGuffin, L. J., Bryson, K. y Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404-405.
- Morais, M. C., Fisher, M., Kanamaru, S., Przybyla, L., Burgner, J., Fane, B. A. y Rossmann, M. G. (2004). Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage phiX174. *Mol Cell*, 15(6), 991-997.
- Morgan, M. M., Macreadie, I. G., Harley, V. R., Hudson, P. J. y Azad, A. A. (1988). Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology*, 163(1), 240-242.

- Muller, H., Islam, M. R. y Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol*, 97(1-2), 153-165.
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987). The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology*, 159(1), 174-177.
- Muller, H., Scholtissek, C. y Becht, H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol*, 31(3), 584-589.
- Mundt, E., Kollner, B. y Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol*, 71(7), 5647-5651.
- Munshi, S., Liljas, L., Cavarelli, J., Bomu, W., McKinney, B., Reddy, V. y Johnson, J. E. (1996). The 2.8 Å structure of a T = 4 animal virus and its implications for membrane translocation of RNA. *J Mol Biol*, 261(1), 1-10.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. (1999). Birnaviridae. In *Veterinary Virology*, pp. 405-409 Academic Press.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Lebedev, A., Wilson, K. S. y Dodson, E. J. (1999). Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55(Pt 1), 247-255.
- Negash, T., al-Garib, S. O. y Gruys, E. (2004). Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet Q*, 26(2), 76-87.
- Nicoll, W. S., Boshoff, A., Ludewig, M. H., Hennessy, F., Jung, M. y Blatch, G. L. (2006). Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. *Protein Expr Purif*, 46(1), 1-15.
- Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J. R. y Rodríguez, J. F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology*, 322(1), 135-142.
- Ozel, M. y Gelderblom, H. (1985). Capsid symmetry of viruses of the proposed Birnavirus group. *Arch Virol*, 84(3-4), 149-161.
- Pan, J., Dong, L., Lin, L., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Havens, W. M., Nibert, M. L., Baker, T. S., Ghabrial, S. A. y Tao, Y. J. (2009). Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4225-4230.
- Pan, J., Vakharia, V. N. y Tao, Y. J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18), 7385-7390.
- Park, S. C., Jia, B., Yang, J. K., Van, D. L., Shao, Y. G., Han, S. W., Jeon, Y. J., Chung, C. H. y Cheong, G. W. (2006). Oligomeric structure of the ATP-dependent protease La (Lon) of *Escherichia coli*. *Mol Cells*, 21(1), 129-134.

- Pascual, E. (2013). Bases estructurales de la cápsida del virus de la bursitis infecciosa para el desarrollo de futuras aplicaciones biotecnológicas, Universidad Autónoma de Madrid.
- Pei, J., Kim, B. H. y Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res*, 36(7), 2295-2300.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612.
- Popa, M. P., McKelvey, T. A., Hempel, J. y Hendrix, R. W. (1991). Bacteriophage HK97 structure: wholesale covalent cross-linking between the major head shell subunits. *J Virol*, 65(6), 3227-3237.
- Pradhan, S. N., Prince, P. R., Madhumathi, J., Roy, P., Narayanan, R. B. y Antony, U. (2012). Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 148(3-4), 293-301.
- Prasad, B. V. y Schmid, M. F. (2012). Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol*, 726, 17-47.
- Raleigh, E. A., Elbing, K. y Brent, R. (2002). Selected topics from classical bacterial genetics. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 1, Unit 1 4.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J. y Barrett, A. J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D320-325.
- Rong, J., Jiang, T., Cheng, T., Shen, M., Du, Y., Li, S., Wang, S., Xu, B. y Fan, G. (2007). Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 25(46), 7900-7908.
- Root, M. J., Kay, M. S. y Kim, P. S. (2001). Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science*, 291(5505), 884-888.
- Rossmann, M. G., Greeve, J. M., Kolatkar, P. R., Olson, N. H., Smith, T. J., McKinlay, M. A. y Rueckert, R. R. (1997). Rhinovirus attachment and cell entry. In *Structural biology of viruses*, pp. 105-133: Oxford University Press.
- Rost, B., Yachdav, G. y Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue), W321-326.
- Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. y Karplus, M. (1995). Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins*, 23(3), 318-326.
- Salussolia, C. L., Gan, Q., Kazi, R., Singh, P., Allopenna, J., Furukawa, H. y Wollmuth, L. P. (2013). A eukaryotic specific transmembrane segment is required for tetramerization in AMPA receptors. *J Neurosci*, 33(23), 9840-9845.

- San Martin, C. (2012). Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*, 4(5), 847-877.
- Sanchez, A. B. y Rodriguez, J. F. (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, 262(1), 190-199.
- Saugar, I., Irigoyen, N., Luque, D., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2010). Electrostatic interactions between capsid and scaffolding proteins mediate the structural polymorphism of a double-stranded RNA virus. *J Biol Chem*, 285(6), 3643-3650.
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodriguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. y Caston, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure*, 13(7), 1007-1017.
- Schmidt, U. y Darke, P. L. (1997). Dimerization and activation of the herpes simplex virus type 1 protease. *J Biol Chem*, 272(12), 7732-7735.
- Schneemann, A., Zhong, W., Gallagher, T. M. y Rueckert, R. R. (1992). Maturation cleavage required for infectivity of a nodavirus. *J Virol*, 66(11), 6728-6734.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68(5), 850-858.
- Shubhada, S. y Sundaram, P. V. (1993). Borate ion-assisted stabilization of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* by polyhydroxy compounds in water-miscible organic solvents. *Enzyme Microb Technol*, 15(10), 881-886.
- Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. y Duncan, R. (2002). Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology*, 296(2), 241-250.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317.
- Speir, J. A. y Johnson, J. E. (2012). Nucleic acid packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol*, 22(1), 65-71.
- Spies, U. y Muller, H. (1990). Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol*, 71 (Pt 4), 977-981.
- Spies, U., Muller, H. y Becht, H. (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res*, 8(2), 127-140.
- Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. y Conway, J. F. (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol*, 15(2), 227-236.

- Sun, S., Rao, V. B. y Rossmann, M. G. (2010). Genome packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol*, 20(1), 114-120.
- Sun, X. J., Wang, Z., Wang, L., Jiang, Y., Kost, N., Soong, T. D., Chen, W. Y., Tang, Z., Nakadai, T., Elemento, O., Fischle, W., Melnick, A., Patel, D. J., Nimer, S. D. y Roeder, R. G. (2013). A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis. *Nature*.
- Tacken, M. G., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J. y Boot, H. J. (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol*, 76(22), 11301-11311.
- Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. y Peeters, B. P. (2000). Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol*, 81(Pt 1), 209-218.
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I. y Ludtke, S. J. (2007). EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol*, 157(1), 38-46.
- Teninges, D., Ohanessian, A., Richard-Molard, C. y Contamine, D. (1979). Isolation and Biological Properties of Drosophila X Virus. *Journal of General Virology*, 42(2), 241-254.
- Tsukamoto, K., Kojima, C., Komori, Y., Tanimura, N., Mase, M. y Yamaguchi, S. (1999). Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology*, 257(2), 352-362.
- Tsukamoto, K., Saito, S., Saeki, S., Sato, T., Tanimura, N., Isobe, T., Mase, M., Imada, T., Yuasa, N. y Yamaguchi, S. (2002). Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *J Virol*, 76(11), 5637-5645.
- Tuthill, T. J., Groppelli, E., Hogle, J. M. y Rowlands, D. J. (2010). Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 343, 43-89.
- Uchiyama, A., Heiman, P. y Fane, B. A. (2009). N-terminal deletions of the phiX174 external scaffolding protein affect the timing and fidelity of assembly. *Virology*, 386(2), 303-309.
- Valli, A., Busnadiego, I., Maliogka, V., Ferrero, D., Caston, J. R., Rodriguez, J. F. y Garcia, J. A. (2012). The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes. *PLoS One*, 7(9), e45957.
- van Heel, M. (1984). Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, 13(1-2), 165-183.
- Veesler, D. y Johnson, J. E. (2012). Virus maturation. *Annu Rev Biophys*, 41, 473-496.

Vieux, E. F., Wohlever, M. L., Chen, J. Z., Sauer, R. T. y Baker, T. A. (2013). Distinct quaternary structures of the AAA+ Lon protease control substrate degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(22), E2002-2008.

Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M. y Sandino, A. M. (2004). Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.*, 78(24), 13829-13838.

Walz, J., Tamura, T., Tamura, N., Grimm, R., Baumeister, W. y Koster, A. J. (1997). Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo. *Mol Cell*, 1(1), 59-65.

Wang, C., Jiang, P., Sand, C., Paul, A. V. y Wimmer, E. (2012). Alanine scanning of poliovirus 2CATPase reveals new genetic evidence that capsid protein/2CATPase interactions are essential for morphogenesis. *J Virol*, 86(18), 9964-9975.

Wei, L., Hou, L., Zhu, S., Wang, J., Zhou, J. y Liu, J. (2011). Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology*, 417(1), 211-220.

Wriggers, W. y Birmanns, S. (2001). Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J. Struct. Biol.*, 133(2-3), 193-202.

Wu, Y., Hong, L., Ye, J., Huang, Z. y Zhou, J. (2009). The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol*, 154(12), 1873-1882.

Xu, H. T., Si, W. D. y Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology*, 322(1), 199-210.

Yeager, M. (2011). Design of in vitro symmetric complexes and analysis by hybrid methods reveal mechanisms of HIV capsid assembly. *J Mol Biol*, 410(4), 534-552.

Yost, S. A. y Marcotrigiano, J. (2013). Viral precursor polyproteins: keys of regulation from replication to maturation. *Curr Opin Virol*, 3(2), 137-142.